



Les progéniteurs multipotents exprimant Flt3 source des précurseurs T extra-thymiques

Vanessa Zepponi

► To cite this version:

Vanessa Zepponi. Les progéniteurs multipotents exprimant Flt3 source des précurseurs T extra-thymiques. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T071 . tel-00806094

HAL Id: tel-00806094

<https://theses.hal.science/tel-00806094>

Submitted on 29 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Vanessa ZEPPONI

Le 26 octobre 2012

Les progéniteurs multipotents exprimant Flt3 source des précurseurs T extra-thymiques

Jury :

Docteur Laure COULOMBEL

Présidente

Docteur Sophie EZINE

Directeur de thèse

Docteur Michèle GOODHARDT

Rapporteur

Docteur Bruno CANQUE

Rapporteur

Docteur Delphine SAUCE

Examineur

Docteur Paulo Vieira

Examineur

Travail effectué à l'INSERM U1020 Différentiation et Physiologie des Lymphocytes T
156 rue de Vaugirard 75015 Paris

À mon père (1961-2012),

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Sophie, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour toutes les choses que tu m'as apprises, pour ta disponibilité et ta patience (ce qui a dû être difficile des fois!).

Je remercie le Dr. Michèle GOODHARDT, le Pr. Bruno CANQUE, le Dr. Delphine SAUCE, le Dr. Paulo Vieira et le Dr. Laure COULOMBEL d'avoir accepté de faire parti de mon jury, d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail et de participer à ma soutenance de thèse.

Un grand merci à Benedita qui m'a accueilli au sein de son unité. Je te remercie pour nos discussions et échanges lors de nos réunions de labo ainsi que pour tes conseils !

Orly, je te remercie de toutes les discussions que l'on a pu avoir sur tout et rien !

Je remercie enfin Corinne pour sa présence et sa disponibilité.

Dans le groupe des ITA :

Je tiens en toute première place à remercier très chaleureusement Valérie qui m'a appris tous les expériences que j'ai eu à réaliser pendant ma thèse... de la dissection à l'utilisation du Canto ! Merci beaucoup d'avoir pris de ton temps pour moi.

Je remercie Agnès qui m'a beaucoup épaulé lors de mes manip interminables et surtout lors du sacrifice de toutes ces souris !! Tu es devenu une pro en boucherie ;)

Merci à Guillaume pour nos pauses café !

Je termine en disant un grand MERCI à Florence qui a toujours été là pour m'écouter et aussi me conseiller tout au long de ces 3 années au sein du labo... ayant un peu (voir beaucoup) le même caractère que toi tes conseils m'ont été d'une aide précieuse. Je serais toujours dispo pour qu'on aille se boire un verre ou se faire un resto ensemble !

Enfin je tiens à remercier Véronique, Benoit, Chantal et Evelyne pour leur aide au quotidien et on se rend bien compte qu'ils sont indispensables lorsqu'ils sont absents !

Parmi les post-docs :

Lamia... je ne sais pas par où commencer dans tous les remerciements que j'ai à te faire ! Tu as toujours été là pour moi, même si des fois j'ai été insupportable ! Merci de ta gentillesse, de ta présence, de ton soutien dans les moments difficiles, en fait merci d'être toi et d'avoir beaucoup compté pour moi et de toujours être présente dans ma vie ! Je sais que tu auras toujours une place dans mon cœur.

Patricia, tu m'as fait découvrir la caïpirinha et tu m'as appris toutes tes astuces sur le Canto, entre autre et pour tout ça (surtout le premier point) je te remercie et te souhaite de réussir dans ce que tu as entrepris. Et tu serais fière de moi car j'ai accompli la mission que tu m'avais laissé ;)

Alessia ou la plus parisienne des italiennes ;) tu m'as fait découvrir Paris alors que j'y suis arrivée avant toi !! Merci de tous les bons moments que l'on a passé ensemble qui j'espère continueront même après mon départ !

Qu'aurez été mon passage à l'U1020 sans avoir fait la connaissance de toi Laeti... Avec qui j'aurais pu faire les pauses café ;) Je suis vraiment très heureuse d'avoir fait ta connaissance et ça tu t'en doutes sinon on ne continuerait pas à s'appeler tous les soirs (au moins) après ton départ ! Ta nouvelle carrière a commencé et je sais que tu vas y arriver car malgré tout tu es une battante !

Gerald, I was really surprised that you manage in so few times to be a so good research in Immunology. We pass some really good after-works together with your wife ! I'm really glad of meeting both of you ! Let's see us again in Rue Mouffetard...

Aleks, très heureuse de t'avoir rencontré et même si on ne te voit pas souvent à cause de ton amour inconditionnel pour la microcopie j'ai beaucoup apprécié nos petites discussions.

Dans le groupe des thésards (dont une grande majorité nous a déjà quittés...) :

Sung... tellement de choses à dire et si peu de place ! Alors je vais me contenter de dire merci pour tous ces bons moments photographiques et culinaires !!

Merci à Amine d'avoir toujours été là pour m'expliquer tous ce que j'avais besoin de savoir sur la création du Multiplex et pour m'avoir aider même en étant de l'autre côté de l'océan à calculer des barres d'erreurs !

Sylvain... mon cher voisin de bureau qui m'a beaucoup embêté lors de sa présence au labo ;) Merci pour nos discussions et pour m'avoir appris ce jeu fou de lapin crétin ! Je sais que tu as beaucoup apprécié ta rencontre avec mon cher Maurice qui a toujours beaucoup aimé ces vacances chez toi.

Marie, je suis très heureuse d'avoir pu faire ta connaissance même si ça a été sur une courte période mais maintenant tu comptes parmi mes amis ! Et le mari de Marie aussi Mister David !! Merci d'être présent tous les deux et merci pour les soirées et cours de photo que nous faisons ensemble !!

Mon compagnon de galère dans l'épreuve de la soutenance, Miguel, je te souhaite tous le courage pour terminer ta thèse en beauté ! Merci de ta présence et d'avoir

toujours su utilisé les bons mots pour arriver à tes fins (ma très chère Vanessa peut tu... et j'en passe et des meilleurs). Courage !!!!

The last but not the least... Sara ! Que dire... Merci d'être là et d'être comme tu es... une pile électrique toujours à fond !!! Tu as été ma voisine de paillasse pendant ces 3 années, voisine un peu envahissante par moment mais bon on ne va pas revenir là-dessus ;) J'avais reçu une mission et je pense l'avoir bien accompli... J'espère que tu en es contente !! Ne t'inquiètes pas trop pour ta thèse je suis persuadé que tu vas y arriver il n'y a pas de raison je l'ai fait pourquoi pas toi ? Je te souhaite plein de courage et tu sais que ma porte t'es toujours ouverte !! Et surtout amène moi découvrir ton Portugal :D Obrigado por tudo !! Até breve...

Les amis :

Je voudrais dire un grand merci à mes amis (hors ceux du labo car je m'y suis fait de réelles amitiés) : Diane, Virginie et Dim (ainsi que leurs amoureux Thibault dit le Belge, Fred et Jonathan). Et là je suis perdue je ne sais pas comment les remercier... sans eux je pense que j'aurais craqué plus d'une fois mais ils ont toujours été là pour moi jour ou nuit !! Merci les filles ;) Je sais que nous sommes dans le même bateau et que votre soutenance va arriver enfin déjà l'écriture de votre thèse ! Je serais toujours là pour vous épauler car j'y suis passé aussi !!

Merci à Diane qui me suis depuis ... on ne va pas en parler ça va nous faire devenir plus vieilles !! Merci d'avoir toujours été là à mes côtés dans les bons et les moins bons moments qui ces derniers temps ont été assez nombreux je l'avoue mais tu n'as pas flanché toujours présente !! Merci pour notre découverte du Canada et de NYC ça a été un super voyage et merci pour tous les magnets que tu me ramènes de tes voyages !!! Je t'aime fort fort ;)

Merci Virginie de m'avoir nommé témoin de ton mariage ;) tu n'imagines pas à quel point ça compte pour moi (même si c'est pour épouser le Belge !!) Tu as toi aussi toujours été là dans les mauvais moments comme dans les bons... J'espère que maintenant on va pouvoir partager les bons ☺. Merci de m'avoir transmis la passion des bijoux enfin merci je ne suis pas sûr j'en ai tellement maintenant que je pourrais ouvrir un magasin !!!

Dim... Merci d'être là !! On est monté ensemble sur Paris toi pour l'Oréal moi pour l'INSERM... Je suis heureuse d'avoir partagé toutes ces soirées avec toi et d'avoir rencontré les Gaillards de Paris ;) Tu as toi aussi toujours été là pour moi même si tu as toujours très occupé et pour ça je ne peux que te dire MERCI.

Merci enfin à Fred et Thibault ! Je vous taquine beaucoup (et vous me le rendez bien) mais vous aussi je pense que ma vie aurait été différente si vous n'en aviez pas fait partie enfin surtout de celles de Diane et Vir respectivement ! Vous avez toujours su me faire rire !! Vous êtes une sacrée équipe ne changez rien !!

Et pour terminer avec les amis : Mr Bruno !! Tu es rentré dans ma vie depuis peu (enfin deux ans maintenant) mais je crois que ça a été une superbe rencontre !! Tu es un type extra et n'en doutes pas !! Tes coups de fil tous les soirs m'ont souvent permis de tenir... Les épreuves je les ai traversées avec et grâce à toi alors MERCI BEAUCOUP !! Et merci aussi de m'avoir rendu encore plus shopping addict et i-phone addict ;) Merci d'être là !! (J'ai cherché la couleur Vuitton pour toi mais je n'ai pas trouvé désolée ;))

La dernière catégorie et pas des moindres c'est ma famille !

Je remercie très très chaleureusement mon oncle et parrain Christian !! Tu as toujours été là pour moi et même si on ne se voit pas souvent tu as une grande place dans mon cœur ! Merci d'être là et surtout merci de venir à Paris pour ma soutenance et de faire l'aller-retour dans la journée juste pour être là ! Merci à ma tata Mumu d'être là de venir aussi, de me soutenir et de m'avoir fait découvrir les produits Natura ;) Merci à vous deux d'être là sans vous tous serait vraiment différents !!

Maman... je pense que sans elle je ne serais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui ! Elle m'a toujours porté pour que j'en arrive là où j'en suis elle m'a soutenue même quand j'allais trop loin (ceux qui arrivaient souvent je dois dire et qui continue encore parfois). Alors à part te dire merci pour tous, pour la vie que tu m'as donnée (dans les deux sens du terme), pour ta présence et ton soutien immense !! Je sais que tu es fière de moi et c'est tous ce qui compte (et que tu racontes mes réussites à tous le village...).

Mémé ! Les choses n'ont pas toujours été facile entre nous mais ce n'est pas grave on s'est retrouvé et c'est l'essentiel. Alors merci de faire partie de ma vie et de m'avoir donnée ton caractère bien trempé qui m'est très utile ici !!

Je remercie aussi ma tata préféré de me faire rire et d'être là dans ma vie et de m'avoir donné une super filleule Jade que j'aime tant !!

Papa... tu m'as quitté sans avoir pu voir que j'avais réussi... si près du but ! Les choses n'ont pas toujours été évidente entre nous je le sais mais tu étais mon père et je t'aimais et tu seras toujours dans mon cœur, près de moi ! J'aurais tellement aimé que tu sois là et que tu sois fier de moi, de ce que j'ai accompli malgré les difficultés... Alors je veux juste te dire Merci... et que de là où tu es, tu es heureux pour moi et fier.

Vanessa ZEPPONI

Age : 28 ans

Téléphone : 06 64 67 50 18

Adresse : 7 rue Ledion 75014 Paris

Mail : vanessa.zepponi@gmail.com



Cursus universitaire

2009-2012 : Doctorat en Immunologie, Ecole Doctorale Gc2iD, Paris Descartes. Soutenance prévue le 26 octobre 2012.

2008-2009 : Master II recherche Développement et Immunologie option Immunologie, Faculté de Luminy, Aix-Marseille II.

2007-2008 : Master I de Biologie des Eucaryotes, Faculté de Luminy, Aix-Marseille II.

Langues : **Anglais** : lu / parlé / écrit TOIEC (2007, score : 810)
 Espagnol : lu / parlé

Expériences professionnelles

Depuis Octobre 2009 : Thèse à l'unité INSERM U1020 dirigée par le Dr B. Rocha (Institut Necker) sous la direction du Dr S. Ezine « Les progéniteurs multipotents exprimant Flt3 source des précurseurs T extra-thymiques ».

Février à Août 2009 : Stage de recherche dans le cadre du Master 2 au sein de l'IBDML UMR-6216, Marseille dans l'équipe du Dr R. Kelly sous la direction du Dr F. Rochais « Régulation des cellules progénitrices cardiaques chez la souris ».

Publications

A. Boudil, **V. Zepponi**, L. Skhiri et S. Ezine, *Au bout d'un long voyage à travers des sites et des potentialités multiples, la Lymphopoïèse T*. Hématologie 2011, Volume 17 Numéro 1.

V. Zepponi, C. Martinez-Cingolani, A. Boudil, V. Pasqualetto, L. Skhiri, L. Gautreau, A. Legrand, J. Megret, F. Zavala, S. Ezine, *Extrathymic pre-T cells are generated by multipotent progenitors rather than common lymphoid progenitors* (en soumission).

Participations aux congrès

14^{ème} Forum de l'Ecole Doctorale Gc2iD (31 mars au 1^{er} avril 2011, Rueil Malmaison) Présentation orale.

EUThyme-Rolduc Meeting (21 au 24 mai 2011 Leeuwenhorst, Hollande) Poster.

16th International Summer School on Immunology (3 au 11 septembre 2011, Hvar, Croatie) (Obtention d'une bourse YTF) Poster.

Congrès des Jeunes Chercheurs en Biologie (5 octobre 2011, Paris) Poster.

Congrès Annuel de la Société Française d'Immunologie (8 au 10 novembre 2011, Montpellier) Présentation orale.

15^{ème} Forum de l'Ecole Doctorale Gc2iD (15 au 16 mars 2012, Rueil Malmaison) En auditeur libre (membre du conseil de l'Ecole Doctorale devant être présente).

Compétences techniques

Biologie cellulaire : Analyse multi-paramétrique par cytométrie en flux (8 couleurs).

Biologie moléculaire : RT-PCR, PCR en temps réel, technique du Multiplex.

Expérimentation animale : Prélèvement d'organes et isolation de cellules.

Histologie et biochimie : enrobage des tissus en paraffine et OCT, coupes histologiques (cryostat et paraffine), coloration éosine et X-gal, immunohistochimie, immunofluorescence, hybridation in situ.

Compétences diverses

Informatique: Pack office, Photoshop, Axiovision, EndNote, FlowJo, BD FACSDiva, Amplify, LinRegPCR, Applied Biosystems SDS, GraphPad Prism.

Conduite de projet : Planification du travail, mise en œuvre de protocoles, gestion du temps et des ressources, veille bibliographique, travail au sein d'une équipe et en autonomie.

Autres intérêts

Représentante des doctorants à l'Ecole Doctorale Gc2iD : membre du conseil et organisatrice du 15^{ème} Forum de l'Ecole Doctorale.

Répresentante des doctorants au Collège des Ecoles Doctorales Paris Descartes (CED).

Membre active de l'association les Cartésiens (Le Cercle des Docteurs et Doctorants de Paris Descartes).

Voyages : Fréquents à travers le monde (USA, Chili, Mexique, Tunisie, Angleterre, Canada, Venezuela...).

Loisirs : Photographie, Archéologie, Lecture.

Table des matières

Abréviations	5
Résumé	7
Introduction	9
I. L'hématopoïèse	10
A) Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	10
1) <i>Généralités</i>	10
a) Découverte des CSH	10
b) Les niches hématopoïétiques.....	11
2) <i>L'auto-renouvellement ou la division à l'identique</i>	13
3) <i>La multipotentialité</i>	15
B) Les progéniteurs multipotents (MPP)	16
1) <i>Les différentes sous-populations de MPP</i>	16
a) Expression de VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1 ou CD106).....	16
b) Expression de Flt3 et VCAM1	17
c) Les progéniteurs multipotents biaisés lymphoïde (LMPP).....	18
2) <i>La localisation des MPP dans la MO est liée à leur potentiel de différenciation</i> 19	
C) Les progéniteurs lymphoïde commun (CLP)	21
1) <i>Identification et caractérisation du CLP</i>	21
2) <i>Les différentes sous-populations de CLP selon l'expression de Flt3</i>	22
3) <i>Controverse sur la potentialité T des CLP</i>	23
D) Les cellules matures	27
1) <i>La lignée myéloïde</i>	27
2) <i>La lignée des lymphocytes B</i>	29
3) <i>La lignée des lymphocytes T</i>	29
a) La structure du thymus	30
b) Le développement intra-thymique	31
II. Les précurseurs T extra-thymiques	31
A) La moelle osseuse.....	32
B) Le sang	33
C) L'intestin	34

D)	La rate.....	36
III.	Les facteurs impliqués dans la différenciation hématopoïétique.....	39
A)	Gata2 : impliqué dans le maintien des CSH.....	40
B)	Gata3 : un rôle dans les CSH et gène clé de l'engagement T	41
C)	Pu1 : le gène multipotent.....	43
D)	Le gène lymphoïde E2A.....	45
E)	L'IL7R et son rôle dans le lignage lymphoïde.....	47
F)	Rôle de la recombinaison dans le développement des cellules lymphoïdes	48
G)	Un gène clé dans la différenciation T : Notch1	49
H)	Les récepteurs aux chimiokines : CCR7 et CCR9	50
	Problématiques et Objectifs	53
I.	Contexte du projet de recherche	54
II.	Problématique	55
III.	Objectifs et approches expérimentales.....	57
	Résultats	59
	Manuscript	
	Discussion	87
I.	Importance de la distinction entre MPP2 et MPP3 : 2 sous-populations distinctes	88
II.	Le CLP n'a pas de potentialité intrinsèque T en absence de thymus	89
III.	Le MPP3 n'est pas la seule source des CLP	90
IV.	Les signaux envoyés par le thymus.....	92
V.	Les niches de la MO soutiennent-elles un engagement vers une voie de différenciation ? 93	
VI.	Le rôle du sang sur les progéniteurs de la MO : importance de l'étude des progéniteurs circulants	96
VII.	Les molécules de migration et d'adhésion : de nouveaux marqueurs précoces pour étudier les mécanismes de l'engagement	97
	Conclusion et perspectives	100
	Annexe	104
	La lymphopoïèse T, à la fin d'un long voyage à travers des sites et des potentialités multiples, Boudil A., Zepponi V., Skhiri L. et Ezine S., Hématologie 2011;17(1):24-39.	
	Références	121

Abréviations

Ac: anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

BCR : récepteur des cellules B

CAR: CXCL12-abundant reticular

CCR9: chemokine receptor 9

CD : cellule dendritique

CD: cluster of differentiation

CE: cellules épithéliales

CFU : colony-forming unit

CLP : progéniteur lymphoïde commun

CMP : progéniteur myéloïde commun

CP: cryptoplaque

CSF: colony stimulating factor (M-CSF: macrophage-CSF, G-CSF: granulocyte-CSF)

CSH : cellule souche hématopoïétique

CTP: committed T cell progenitors (MO)

CTP : circulating T cell progenitor (sang)

DP : double positif (thymocytes CD4⁺CD8⁺)

ETP : progéniteur T précoce

FTOC: fetal thymic organ culture

GMP : progéniteurs macrophages-granulocytes

GPCR : récepteur couplé aux protéines G

IgM : immunoglobuline M

IL : interleukine

MEP : progéniteurs méga-érythrocytes

MO : moelle osseuse

LIE : lymphocyte intra-épithéliaux
Lin: lignage
LMPP : progéniteur multipotent biaisé lymphoïde
LSK: Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺
LT-CSH : cellule souche hématopoïétique à long terme
MPP : progéniteur multipotent
NK : natural killer
SC : colonies spléniques
Sca1: stem-cell antigen 1
SCID: severe combine immunodeficient
SC12 : colonies spléniques à 12 jours (post greffe)
SCF: stem cell factor
SLAM: signaling lymphocyte activation molecule
SP: simple positif
ST-CSH : cellule souche hématopoïétique à court terme
TGFβ: transforming growth factor β
TN: triple négatif
TCR : récepteur des cellules T
VCAM1: vascular cell adhesion molecule 1

Résumé

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de phénotype LSK (Ligneage⁻c-Kit⁺Sca1⁺) sont à l'origine de toutes les lignées sanguines. Leur maturation passe par la génération de progéniteurs multipotents (MPP), subdivisés grâce à l'expression de VCAM-1 et Flt3 (VCAM-1⁺Flt3⁻: MPP1, VCAM-1⁺Flt3⁺: MPP2 et VCAM-1⁻Flt3⁺: MPP3). Les MPP3 se différencient en progéniteur lymphoïde commun (CLP), source de la lignée B. Sa contribution à la génération de la lignée T reste controversée.

La lignée T principale est issue d'un progéniteur de la MO qui a colonisé le thymus. Il existe aussi une lignée T extra-thymique, identifiées au sein de différents organes (l'intestin, la MO, le sang et la rate) dont la maturation se termine dans le thymus ou l'intestin. Une des questions importantes est de savoir si ces 2 lignées sont issues de la même source. Nous nous sommes intéressés à la lignée de pré-T extra-thymique (de la rate): Lin⁻Thy1.2⁺ CD25⁺Il7Rα⁺. Ces derniers sont très abondants chez la souris athymique (5-6 fois plus que chez la souris contrôle C57BL/6). Notre but a été de définir la source de cette lignée parmi les progéniteurs de la MO.

Suite aux transplantations des différents compartiments hématopoïétiques de la MO à des receveurs athymiques irradiés, nous avons montré que les MPP3 (VCAM1⁻Flt3⁺) sont la population plus douée d'activité pré-T. Au contraire, les CLP génèrent des lymphocytes B matures (CD19⁺IgM⁺). Ces données sont confortées par l'étude de l'expression de gènes lymphoïdes et myéloïdes qui indique l'engagement lymphoïde précoce d'une sous- population de MPP3. Les cellules progénitrices de la MO qui colonisent la rate (et le thymus) doivent circuler par le sang pour pouvoir coloniser ces organes. La population de MPP majoritaire en circulation est les MPP3. De plus, l'analyse du profil d'expression des gènes des récepteurs aux chimiokines et d'autres gènes spécifique de la différenciation apporte de nouvelles informations sur le potentiel T intrinsèque des progéniteurs de la MO.

L'ensemble des données accumulées permettent de conclure que les MPP3 sont de bons candidats pour la génération des pré-T extra-thymiques et que l'engagement lymphoïde commencé dans la MO se termine dans le sang grâce au maintien de l'expression de Notch1.

Introduction

I. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui permet la production des cellules du sang indispensable à la survie d'un individu / organisme vivant (protection contre les virus, bactéries...). Toutes les cellules du système immunitaire proviennent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui résident dans la moelle osseuse (MO). Ces dernières permettent le maintien de l'homéostasie et la production de cellules suite à des dommages dans les compartiments hématopoïétiques.

A) Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

1) Généralités

a) Découverte des CSH

Dans les années 1960, les expériences de Till et McCulloch ont pour la première fois démontrées l'existence d'une CSH localisée dans la MO et capable de générer les différentes lignées sanguines. Suite à l'injection de cellules de MO à des souris létalement irradiées, ces dernières migraient dans la rate et formaient des nodules appelés colonies spléniques (SC : spleen colony). Ces cellules de MO sont alors nommées CFU (colony-forming unit). De plus, une corrélation entre le nombre de cellules injectées et le nombre de SC obtenues a été observée (Till and Mc, 1961).

Plusieurs années plus tard, en 1988, l'équipe d'I.L. Weissman a été la première à identifier et caractériser les CSH. Grâce à des anticorps (Ac) monoclonaux liant des antigènes de surface de cellules différenciées et l'utilisation de la cytométrie de flux, ils ont pu isoler les fractions de cellules matures (lignée⁺: Lin⁺) reconnues par les Ac des populations de la fraction immature (Lin⁻). L'utilisation de l'Ac dirigé contre Sca1 (Stem-Cell Antigen 1 : protéine phosphatidyl-inositol ancrée dans la membrane) (Aihara et al., 1986) a permis l'identification d'une population Lin⁻Sca1⁺. Cette population est capable de reconstituer les

différentes lignées hématopoïétiques (cellules T : Thy1⁺, B : B220⁺ et myéloïdes : Gr1⁺) et de former des CFU dans la rate avec une plus grande efficacité que la MO totale et les cellules Lin⁻ (1 CFU pour 10 000 MO totale, 1 CFU pour 31 Lin⁻ contre 1 CFU pour 10 Lin⁻ Sca1⁺) (Spangrude et al., 1988). C'est en 1991 que l'identification de la population Lin⁻ Sca1⁺c-Kit⁺ (c-Kit : récepteur à tyrosine kinase dont le ligand est le Stem-Cell Factor : SCF), capable de faire des CFU (1 pour 8 cellules injectées) fut définitivement identifié (Ikuta and Weissman, 1992). Ces études ont ainsi permis d'établir un phénotype de référence permettant d'identifier la population progénitrice chez la souris : Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (LSK).

Chez l'Homme, les marqueurs cellulaires sont différents et les CSH humaines ont quant à elles pour phénotype : Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺CD49f⁺ (Notta et al., 2011).

b) Les niches hématopoïétiques

Le terme de niche est apparu avec Schofield en 1978. Il a émis l'hypothèse que, dans la MO, les CSH devaient être en association avec d'autres cellules qui leur permettent de maintenir leur état de cellules souches tout au long de la vie de l'individu. En effet, des échanges entre les CSH et les cellules composants ces niches sembleraient contrôler l'auto-renouvellement et inhiber la différenciation des CSH (Schofield, 1978). Il a depuis été démontré que les niches étaient constituées d'ostéoblastes produisant des molécules régulatrices de l'hématopoïèse (G-CSF, M-CSF ou l'IL6) ainsi que des facteurs inhibiteurs du cycle cellulaire (TGFβ). De plus, des expériences de co-culture ont montré que ces derniers participaient à la culture de MO à long-terme (Taichman and Emerson, 1998). Cette niche a alors été appelé niche ostéoblastique. Une autre étude (Calvi et al., 2003) a démontré l'influence des ostéoblastes sur les CSH. En effet, suite à l'injection d'hormone parathyroïde (qui active les ostéoblastes), une augmentation significative du nombre de CSH (en corrélation avec une augmentation des ostéoblastes) a pu être observée.

Par la suite, plusieurs articles ont proposé des modèles de niches selon leur constitution cellulaire et ont démontré l'existence de 2 niches supplémentaires pour les

CSH. Il a donc été mis en évidence une niche vasculaire contenant des vaisseaux sanguins (constitué de cellules endothéliales : CE). Les facteurs angiogéniques sécrétés par les CE sont importants dans l'auto-renouvellement et la production de CSH. Ainsi, la niche vasculaire est un composant essentiel du microenvironnement de la MO (pas seulement pour permettre le passage de l'oxygène et des nutriments). En effet, elle permet une balance entre l'expansion et la différenciation des CSH grâce à la sécrétion de facteurs angiogéniques qui restent à déterminer (Butler et al., 2010).

Pour terminer, la troisième niche mise en évidence est la niche réticulaire constituée de cellules réticulaires appelé cellules CAR (pour CXCL12-abundant reticular). Afin de déterminer le rôle *in vivo* des cellules CAR, une ablation des cellules exprimant CXCL12 a permis la perte de ces cellules (les niches vasculaires et ostéoblastiques des souris mutées sont normales). Ainsi, les cellules CAR (et surtout leur production de SCF et CXCL12) sont importantes pour maintenir le nombre de CSH (leur état prolifératif car dans les mutants les CSH sont plus quiescentes) et leur état indifférencié (dans le mutant il y a une augmentation de l'expression des gènes myéloïdes) (Omatsu et al., 2010). Ces différentes niches (figure 1) sont importantes et en étroites collaborations pour permettre le contrôle de l'auto-renouvellement (et donc du nombre de CSH) ainsi que la production de progéniteurs pour maintenir l'homéostasie ou la re-établir suite à un dommage.

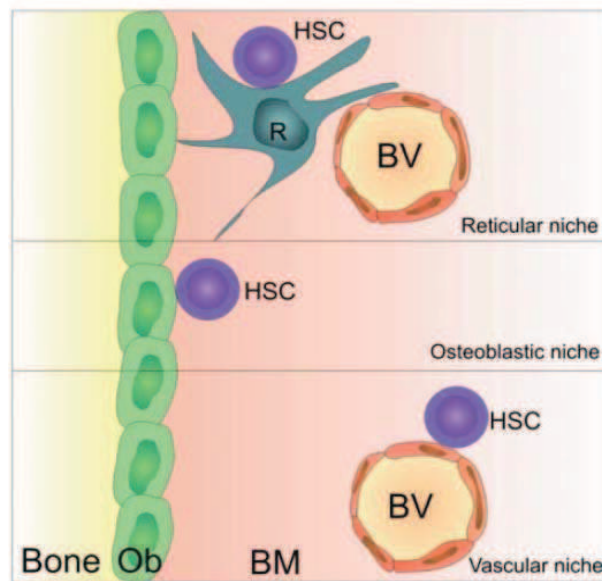


Figure 1 : Les niches hématopoïétiques (Ellis and Nilsson, 2012).

Il existe 3 types de niches différentes : la niche ostéoblastique (composé d'ostéoblastes : Ob), la niche vasculaire (avec les vaisseaux sanguins : BV) et enfin la niche réticulaire (contenant les cellules réticulaires : R).

2) L'auto-renouvellement ou la division à l'identique

C'est un potentiel propre aux CSH. En effet, il permet à ces dernières de se maintenir en un pool constant ce qui permet de conserver les cellules souches tout au long de la vie d'un individu. Ce processus est régi par plusieurs voies de signalisation.

Suite à l'implication des membres de la famille Notch dans la détermination du devenir cellulaire, l'équipe D.T. de Scadden s'est intéressée à l'influence de Notch1 sur les CSH. Pour cela, les cellules $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+$ de souris $\text{Rag1}^{-/-}$ (où la différenciation T et B est bloquée) sont transduites avec un vecteur rétroviral exprimant une forme constitutivement active de Notch1. Grâce à des cultures sur méthylcellulose et des expériences de greffe, Notch1 a pu être démontré comme inhibant la différenciation et augmentant le nombre des CSH (leur auto-renouvellement) (Stier et al., 2002). Cette étude ayant été faite en surexpression de Notch1 et dans des souris $\text{Rag1}^{-/-}$ (car dans des sauvages il y avait induction de leucémie T), ces résultats restent à confirmer. En 2005, la signalisation Notch a été démontrée active dans les CSH (et diminuée quand

ces dernières se différencient). De plus, l'inhibition de Notch, entraîne une différenciation accélérée des CSH et un épuisement de leur pool (Duncan et al., 2005), confirmant ainsi les observations faites précédemment (Stier et al., 2002).

La signalisation Wnt a aussi été impliquée dans l'auto-renouvellement des CSH. L'infection des CSH avec une forme active de la β -caténine (composant de la voie Wnt) entraîne une augmentation du pool de CSH et un maintien de leur état indifférencié. Ceci a été confirmé par des expériences de greffes où les souris injectées avec la forme constitutivement active de la β -caténine ont été mieux reconstituées que les contrôles. De même, le blocage de la signalisation Wnt (en utilisant une forme soluble frizzled cysteine-rich domain qui inhibe la liaison de Wnt à son récepteur frizzled) dans les CSH a entraîné une inhibition de leur expansion ainsi qu'une diminution de leur capacité de reconstitution. Une augmentation de l'expression de Notch a été démontrée par RT-PCR dans les CSH (transfectés avec la forme active de la β -caténine). Ces données démontrent ainsi des liens entre les différents mécanismes permettant l'auto-renouvellement (Reya et al., 2003).

Enfin, GATA-2 appartenant à la famille GATA (facteurs de transcription à doigt de zinc) a été impliqué dans la maintenance et l'homéostasie des CSH grâce à l'utilisation de souris GATA-2^{+/-} dans lesquels, entre autre, une diminution du nombre de cellules LSK a été observé (Rodrigues et al., 2005) (voir le chapitre III. A. 1.).

Les CSH peuvent être divisées en fonction de leur degré d'auto-renouvellement (et de marqueurs de surface) (Morrison and Weissman, 1994). Le premier pool est constitué de cellules Lin⁻CD34⁻ contenant les LT-CSH (long term) qui ont un potentiel d'auto-renouvellement à long-terme (c'est-à-dire tout au long de la vie d'un individu). Dans le deuxième groupe, on retrouve les LSK Mac1^{lo} qui ont un potentiel beaucoup plus court (environ 6-8 semaines) et que l'on nomme les ST-CSH (short-term : court-terme). Le dernier groupe est composé de LSK Mac1^{lo}CD34^{lo} qui sont des progéniteurs multipotents (MPP) dont l'auto-renouvellement est très réduit. Ainsi, les LT-CSH vont donner des ST-CSH qui à leur tour donnent les MPP (l'inverse ne marche pas c'est-à-dire que les MPP ne peuvent jamais donner de ST-CSH ou de LT-CSH) (Morrison et al., 1997) (Figure 2).

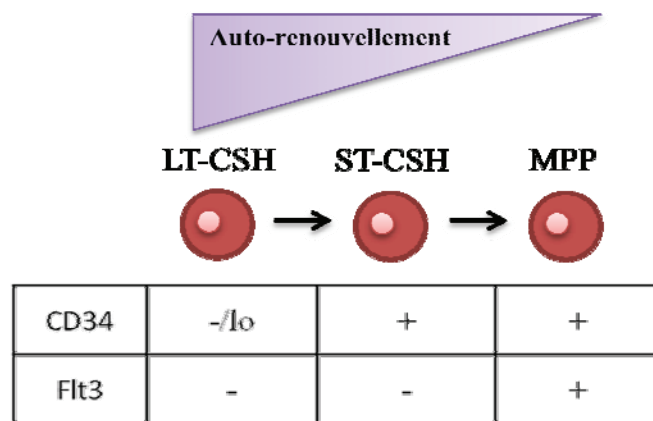


Figure 2 : Hiérarchie des LSK.

Les LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+$) ont été divisés en fonction de leur potentiel d'auto-renouvellement et de leur expression de CD34 (glycoprotéine de surface permettant l'attachement des CSH dans la MO) et Flt3 (ou CD135 récepteur à tyrosine-kinase impliqué dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules) (Yang et al., 2005).

En 2005, une nouvelle identification des CSH a été réalisée en utilisant les marqueurs SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) : CD150, CD244 et CD48. Les CSH ($\text{CD150}^+ \text{CD244}^- \text{CD48}^-$) et les MPP ($\text{CD150}^- \text{CD244}^+ \text{CD48}^-$) ainsi caractérisés ont été comparés avec les mêmes populations triées sur la base de Lin, Sca1 et c-Kit et ont été testés par des expériences de greffe. La possibilité d'utiliser uniquement une combinaison simple de récepteurs SLAM permet ainsi la localisation de ces cellules au sein des niches hématopoïétiques lors de coupe de tissus (Kiel et al., 2005).

3) La multipotentialité

C'est la seconde caractéristique commune à toutes les cellules souches. En effet, les CSH ont la capacité de donner tous les compartiments hématopoïétiques c'est-à-dire les lignées lymphoïdes (T, B et NK) ainsi que les lignées myéloïdes (macrophages, globules rouges, plaquettes granulocytes, cellules dendritiques) (Till and Mc, 1961).

B) Les progéniteurs multipotents (MPP)

Les MPP sont compris dans la fraction de phénotype LSK avec les CSH. Ces cellules sont soumises à des processus de différenciation et d'engagement afin de générer les différentes lignées sanguines. Les MPP ont été caractérisés en utilisant différentes combinaisons de marqueurs cellulaires tel que $\text{Thy1.1}^{-}\text{Flt3}^{+}$. Suite à des expériences de greffe, ces derniers ont été démontrés comme reconstituant toutes les lignées hématopoïétiques de manière transitoire. En effet, la production de cellules myéloïdes (Mac1^{+}), qui ont une courte durée de vie et qui doivent donc être constamment produites, permet de tester l'auto-renouvellement des cellules. Ils ont d'ailleurs fait le lien entre le gain de Flt3 et la perte de Thy1.1 et de l'auto-renouvellement. L'hétérogénéité des MPP a été identifiée après greffe d'un nombre limité de MPP (de 20 à 100 cellules) ; en effet, certains animaux étaient reconstitués uniquement du compartiment lymphoïde démontrant ainsi la présence dans cette population de progéniteurs restreints au lignage lymphoïde (Christensen and Weissman, 2001).

1) Les différentes sous-populations de MPP

a) Expression de VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1 ou CD106)

Afin de caractériser les différents sous-groupes de progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes qu'il pourrait y avoir au sein des MPP, l'expression des molécules de surface différemment exprimée sur les CSH, les précurseurs lymphoïdes (CLP : common lymphoid progenitor) et myéloïdes (CMP : common myeloid progenitor) a été étudié. VCAM1, molécule d'adhésion (cellule / endothélium), est ainsi exprimée sur les CSH et les CMP mais pas sur les CLP. Les MPP ont pu alors être divisés en VCAM1^{+} et VCAM1^{-} . Ces derniers expriment fortement Flt3 comparativement, aux MPP VCAM1^{+} qui sont soit Flt3^{+} soit Flt3^{lo} (Lai et al., 2005).

Les MPP VCAM1^{-} ont un potentiel myéloïde plus faible que les MPP VCAM1^{+} (4% de chimérisme des cellules myéloïdes donneur versus 18%, respectivement) et ont

perdu le potentiel méga-érythrocyte. Les MPP VCAM1⁻ ont un potentiel de différenciation en lignage lymphoïde plus rapide (d'une semaine) et sont plus avancé dans le développement lymphoïde que les MPP VCAM1⁺. Grâce aux expériences de greffe, une hiérarchie entre ces deux groupes a pu être établie : les MPP VCAM1⁺ génèrent les CMP et les MPP VCAM1⁻ ; ces derniers sont à l'origine des CLP. Ils sembleraient donc que les MPP VCAM1⁺ soient le point où les lignages lymphoïdes et myéloïdes se séparent (Lai et al., 2005).

b) Expression de Flt3 et VCAM1

L'utilisation de ces deux marqueurs a permis l'identification de 3 sous populations de MPP (Lai and Kondo, 2006).

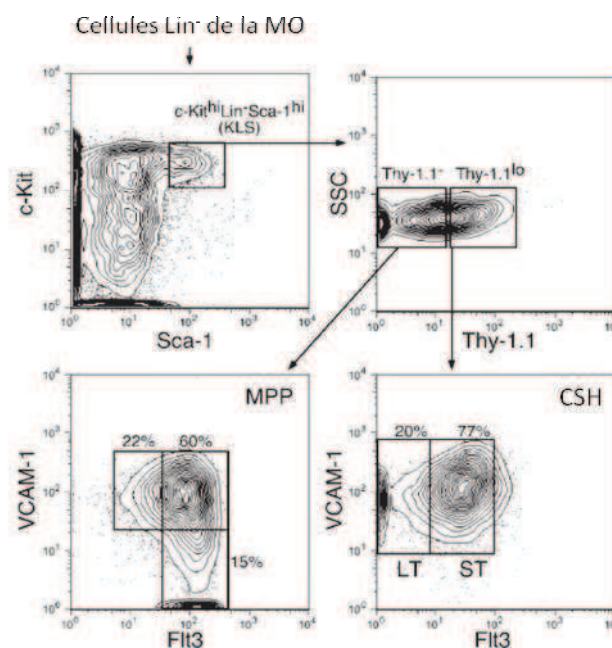


Figure 3 : Expression de Flt3 et VCAM sur les MPP.

On peut ainsi distinguer 3 sous-groupes de MPP : les MPP VCAM1⁺Flt3^{lo}, VCAM⁺Flt3⁺ et les VCAM1⁻Flt3⁺ (Lai and Kondo, 2006) que nous appellerons par la suite MPP1, MPP2 et MPP3, respectivement par souci de facilité.

Leur potentiel a été testé de la même manière que précédemment (Lai et al., 2005) par des expériences de transplantations et de cultures. Ainsi, les MPP1 font partie de la sous population la plus immature ayant un potentiel de différenciation multi-lignées. Les MPP2, quant à eux, ont perdu le potentiel méga-érythrocytes et les MPP3 donnent uniquement des cellules lymphoïdes (Lai and Kondo, 2006). Il est ainsi démontré que la perte du potentiel myéloïde se fait de manière graduelle (Figure 4).

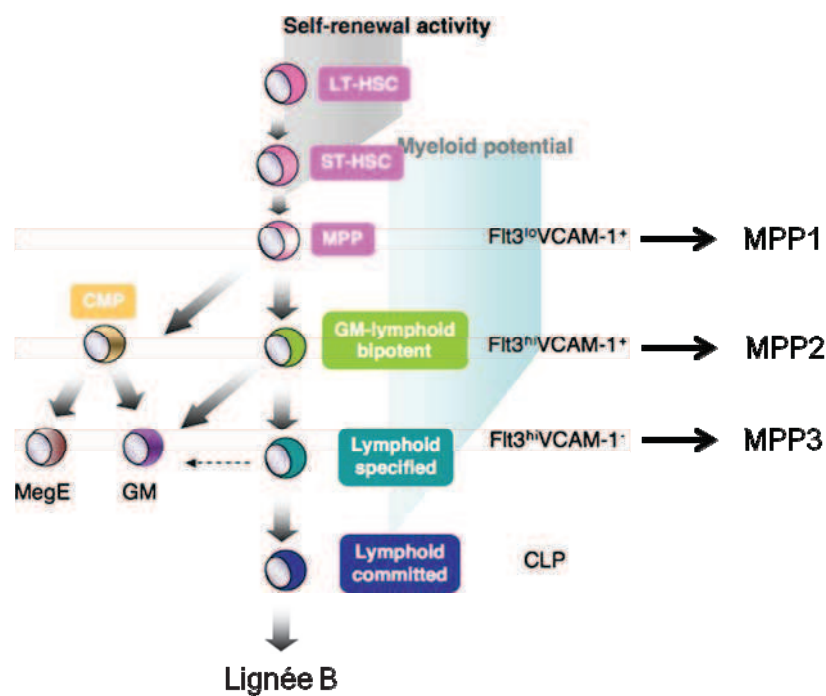


Figure 4 : Un nouvel arbre hématopoïétique (adapté de (Lai and Kondo, 2008)).

Les LT-CSH possèdent le potentiel d'auto-renouvellement le plus important, ce dernier est perdu au stade MPP. La ségrégation entre la lignée myéloïde et lymphoïde n'est pas aussi drastique que pensé précédemment : il s'agit d'une perte graduelle de potentialité.

c) Les progéniteurs multipotents biaisés lymphoïde (LMPP)

En parallèle, l'équipe de S.E. Jacobsen a aussi étudié les MPP et leur subdivision, et se sont également intéressés à l'expression de Flt3. Ils ont ainsi constaté que ce récepteur était fortement exprimé sur les LSK (60% des cellules). Les LSK Flt3⁺ reconstituent

efficacement et rapidement le compartiment lymphoïde mais la reconstitution myéloïde est à court terme (4 semaines). De plus, ces cellules donnent des CLP mais ne sont pas capable de maintenir le pool de LSK (pas de reconstitution secondaire). Ils en ont alors conclu qu'elles devaient être des intermédiaires entre les LSK Flt3⁻ et les CLP (Adolfsson et al., 2001).

La majorité des LSK Flt3⁺ possèdent un potentiel myéloïde mais pas mégakaryocyte. De plus, ces cellules (nommées LMPP : lymphoid-primed multipotent progenitor) ont une augmentation de l'expression de l'IL7R α (impliqué dans le développement des lignées B et T) ce qui suggère un biais vers la voie lymphoïde (Adolfsson et al., 2005). Les LMPP (LSK Flt3⁺) correspondent ainsi aux MPP2 et MPP3 identifiés par l'équipe de M. Kondo.

2) La localisation des MPP dans la MO est liée à leur potentiel de différenciation

Les niches sont des environnements importants pour les cellules leur conférant leurs propriétés (comme l'auto-renouvellement pour les CSH). Même si aucun mécanisme clair n'a été dessiné, il apparaîtrait que les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), en particulier CXCR4 et son ligand SDF1 pour les CSH, soient impliqués dans la localisation et les interactions entre les cellules stromales et les progéniteurs. Les GPCR sont des récepteurs qui suite à la liaison de leur ligand entraîne l'activation de leur protéine G qui va alors échanger son GDP (guanosine diphosphate) pour un GTP (guanosine triphosphate) et pourra alors interagir et activer par phosphorylation un effecteur et ainsi une voie de signalisation (Nagasawa, 2006). Afin de voir si les GPCR sont impliqués dans la localisation des MPP et ainsi dans leur potentiel de différenciation, la toxine pertussis (PTX, inhibiteur des GPCR) a été utilisé. La migration et la prise de greffe des MPP dans la MO ne sont pas influencés par les GPCR. Par contre, l'injection de MPP VCAM1⁻ (MPP3) provenant de souris GFP et de PTX entraîne une augmentation de la différenciation myéloïde de ces cellules qui ne se retrouve pas en culture sur méthylcellulose. L'équipe de M. Kondo émet alors

l'hypothèse qu'il doit y avoir deux microenvironnements un qui permet la différenciation myéloïde et l'autre qui la bloque. La localisation dans l'une ou l'autre de ces niches dépendrait des GPCR. En utilisant des MPP VCAM1⁻ et VCAM1⁺ provenant de donneur GFP⁺, il a ainsi été possible de voir où ces cellules allaient se nicher dans le fémur de souris receveuses.

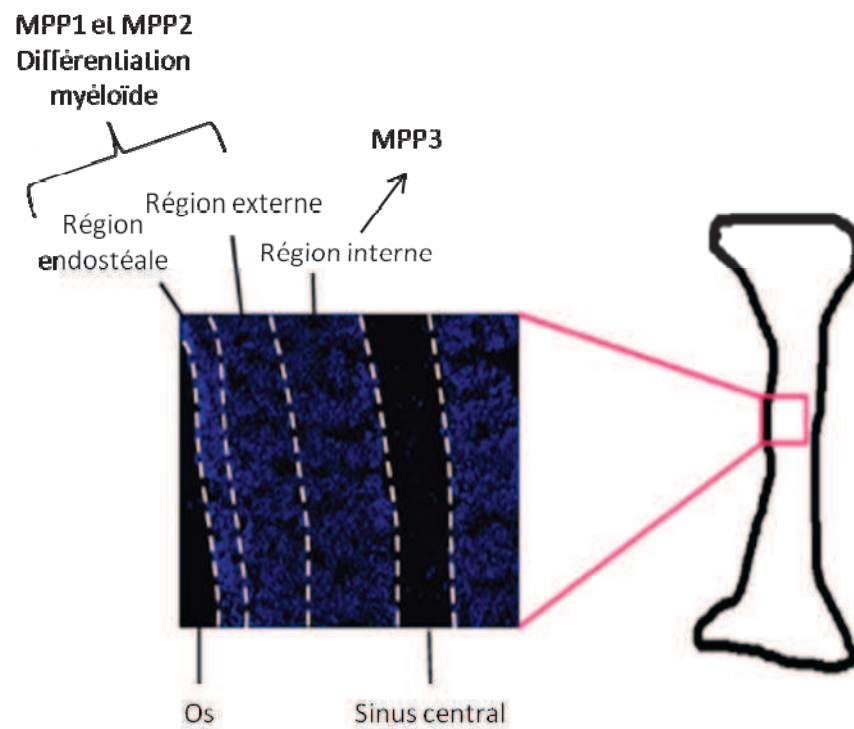


Figure 5 : Représentation de la structure de la MO d'un fémur (adapté de (Lai et al., 2009)).

La MO contenu dans l'os comprend différentes régions (entre l'os a proprement dits et le sinus central) dans lesquels les sous-populations de MPP ont pu être localisées grâce à la visualisation de cellules provenant d'une souris GFP⁺.

Ces travaux indiquent que les MPP VCAM1⁺ se trouvent au niveau des régions endostéale et externe, lieu spécifique qui doit initier et supporter la différenciation myéloïde, alors que les MPP VCAM1⁻ se situent dans la région interne proche du sinus central où cette différenciation n'a pas lieu. En effet, toujours en utilisant les propriétés du PTX, les auteurs constatent que les MPP VCAM1⁻ ne se trouvent plus au niveau du sinus mais dans la même région que les MPP VCAM1⁺ (et les GMP) impliquant ainsi les GPCR dans leur localisation (Lai et al., 2009).

Malgré le fait que le rôle des cytokines ou tout autre facteur reste mal connu dans l'influence du choix vers une différenciation myéloïde ou lymphoïde, la localisation des progéniteurs est importante pour leur devenir et ici, les MPP doivent migrer (de façon GPCR dépendante) vers le sinus central afin de s'éloigner du devenir myéloïde ou de recevoir des informations permettant la différenciation lymphoïde. En effet, la localisation des cellules dans des niches spécifiques ne nous dit pas si l'influence de chaque microenvironnement entraîne un devenir ou si c'est l'éloignement d'un environnement « myéloïde » qui entraîne un choix vers le lignage lymphoïde. Pour cela, la caractérisation des microenvironnements de la MO permettrait de connaître les moyens de régulation d'un choix myéloïde ou lymphoïde.

C) Les progéniteurs lymphoïde commun (CLP)

1) Identification et caractérisation du CLP

Dans l'hématopoïèse, il n'est pas certain que les lymphocytes B et T se développent à partir d'un progéniteur multipotent ou d'un progéniteur plus engagé vers la voie lymphoïde.

Etant donné que l'interleukine 7 (IL7) est une cytokine importante pour le développement des lymphocytes B et T (Peschon et al., 1994), les cellules de la MO ont été triées en utilisant les marqueurs habituels (Lin, c-Kit et Sca1) et le récepteur à l'IL7 (IL7R α). Parmi les cellules Lin⁻, une petite population IL7R α ⁺ et c-Kit^{lo}Sca1^{lo} a été isolée et testée pour définir ses différentes potentialités. Ces progéniteurs, dans les souris receveuses létalement irradiées, ont généré des cellules B, T et natural killer (NK) mais aucun granulocyte ou monocyte (Gr1⁺ ou Mac1⁺). De plus, ces dernières ont une cinétique de génération de cellules lymphoïdes plus rapide que les CSH (environ 7 à 10 jours plus tôt). Afin de confirmer que cette population ne donnait pas

naissance au lignage myéloïde, les progéniteurs ont été mis en culture sur méthylcellulose (permettant la différenciation myéloïde) mais aucune colonie n'a été formée confirmant ainsi que ces cellules sont engagées vers la voie lymphoïde d'où leur nom de CLP (Kondo et al., 1997). L'identification de ces cellules démontre l'existence d'une population de progéniteurs engagés vers la différenciation lymphoïde. Il existe depuis une polémique, sur la potentialité de ces cellules et surtout sur leur capacité à circuler, migrer vers le thymus et générer des lymphocytes T, ce dont je discuterais plus loin.

2) Les différentes sous-populations de CLP selon l'expression de Flt3

Les CLP peuvent être caractérisés sur la base du marqueur Flt3 en deux sous-populations. Les expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les CLP Flt3⁺ donnent des cellules B (CD19⁺), T (TCRβ⁺) et NK (NK1.1⁺) alors que les CLP Flt3⁻ ne donnent que des cellules B et cela même dans le cas d'injection intra-thymique. De plus, les CLP ne donnent pas de cellules de la lignée myéloïde *in vivo* et *in vitro*. En effet, les CLP peuvent donner quelques cellules Mac1⁺ (pas de Gr1⁺) mais qui serait selon les auteurs soit des cellules dendritiques (CD) car elles expriment aussi CD11c soit des NK (Karsunky et al., 2008). Identifier les CD en utilisant Mac1 et CD11c est insuffisant car ces deux marqueurs sont aussi présents sur les macrophages et les monocytes. Il est ainsi important d'ajouter d'autres marqueurs tels que le CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité) assurant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de les activer. Ceci permettrait dans un premier temps de discriminer cellules NK et CD (le CMH II est aussi exprimé sur les macrophages).

Plus récemment, les CLP Flt3⁻ en culture génèrent des cellules B et NK, et sont plus rapides d'environ deux jours dans la génération de lymphocytes B que les CLP Flt3⁺. De plus, la mise en culture de ces derniers entraîne une perte de Flt3 et l'apparition de cellules ayant les caractéristiques des CLP Flt3⁻. Ces données démontrent ainsi une hiérarchie entre les deux sous-populations de CLP : les CLP Flt3⁺ génèrent des cellules

T, B, NK et CLP Flt3⁻ qui sont quant à eux bipotent B / NK (Pereira de Sousa, communication personnelle).

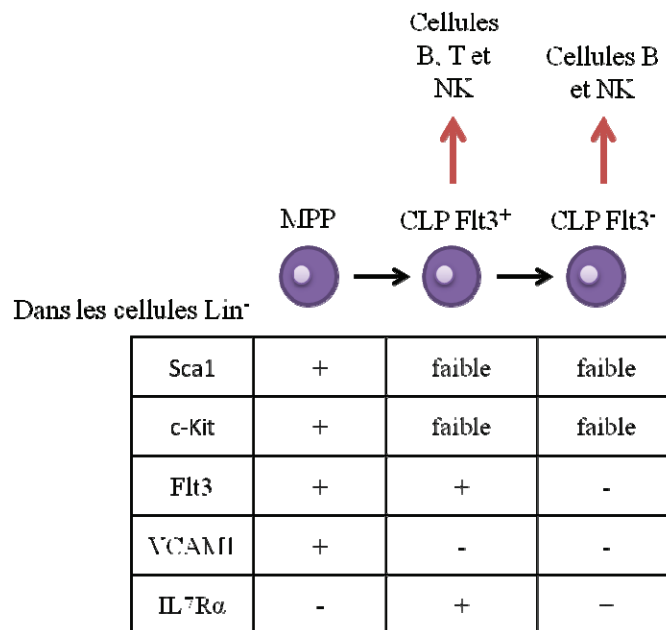


Figure 6 : Phénotypes et potentiels de différenciation des CLP (d'après (Karsunky et al., 2008) et Pereira de Sousa, communication personnelle).

Dans les cellules Lin⁻ de la MO, il existe différentes populations dont les CLP. Ces derniers ont une diminution de l'expression de Sca1 et c-Kit, et expriment l'IL7R. Selon leur expression de Flt3, les CLP ont différentes potentialités tout en restant des progéniteurs lymphoïdes.

3) Controverse sur la potentialité T des CLP

Depuis la découverte du CLP, deux hypothèses sont confrontées sur le fait que ce progéniteur peut donner naissance ou non au lignage T (en effet sa capacité à donner des cellules B n'est pas remise en question). Je vais ainsi développer ci-dessous quelques exemples de cette controverse.

Lors de sa découverte par l'équipe d'I.L. Weissman en 1997, le CLP a été décrit comme le progéniteur lymphoïde commun (à l'origine des lignées B et T) (Kondo et al., 1997).

En 2003, l'équipe d'A. Bhandoola a comparé phénotypiquement et fonctionnellement le progéniteur T précoce (ETP, early T lineage progenitor) du thymus avec le CLP de la MO.

- La réponse à l'IL7 (facteur de survie) des ETP et CLP est différente *in vitro* : les ETP ne répondent pas, suggérant que fonctionnellement ces derniers sont différents des CLP.
- Les ETP ont des niveaux d'expression de marqueurs de surface identique aux LSK, comparativement aux CLP.

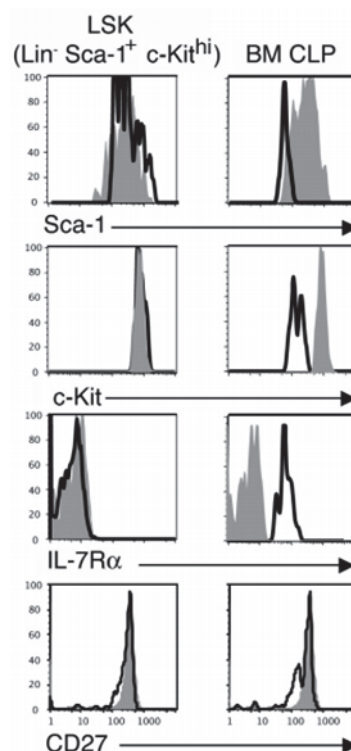


Figure 7 : Comparaison de l'expression de marqueurs de surface sur les LSK, CLP et ETP (Allman et al., 2003).

Histogrammes représentant l'expression de Sca1, c-Kit, IL7R α et CD27 sur les ETP (histogramme plein gris clair), les LSK (trait noir à gauche) et les CLP (trait noir à droite) de la MO.

- Les ETP génèrent peu de cellules B par rapport aux CLP (100 fois moins de cellules CD19⁺) à J21 post-greffe alors que les CLP donnent des lymphocytes B dès J13. Ces résultats ont été confirmés en culture sur le stroma S17.

- Les ETP, 3 semaines post-injection intra-thymique, génèrent 100 fois plus de thymocytes DP (double positifs, $CD4^+CD8^+$) que les CLP. 4 semaines post-greffe, les ETP sont toujours la source de DP contrairement aux CLP. Les ETP permettent le développement des DP sur une plus grande période de temps et en plus grande quantité que les CLP.
- Pour finir les auteurs, en utilisant des souris déficientes pour Ikaros (arrêt précoce du développement B), ont remarqué que ces dernières n'avaient pas de CLP mais possédaient une fréquence normale d'ETP.

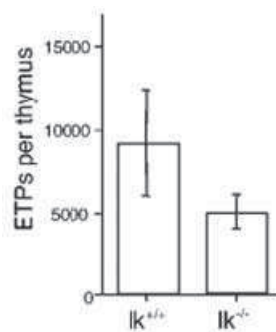


Figure 8 : Nombre absolu d'ETP dans les thymus de souris sauvages et Ikaros^{-/-} (Allman et al., 2003).

Le nombre absolu d'ETP entre les souris Ikaros^{+/+} et Ikaros^{-/-} n'est pas statistiquement différent.

La conclusion de ce travail est que les ETP peuvent se développer via une voie indépendante du CLP et qu'ils proviennent d'un progéniteur hématopoïétique plus précoce que les CLP (Allman et al., 2003). Cette étude permet ainsi de démontrer que le précurseur le plus précoce du thymus (ETP) est différent du CLP en termes de potentialité et phénotype. Il aurait alors été plus intéressant de comparer les ETP aux MPP plutôt qu'aux LSK totaux car la controverse de l'origine de la lignée T se porte entre le CLP et le MPP.

Par la suite, la comparaison du potentiel myéloïde et B des thymocytes a permis de démontrer que les DN1 en culture généraient des cellules Mac1⁺ mais pas de cellules B, les DN2 ont eux perdu aussi le potentiel de donner des macrophages. Par contre, *in vivo*, ces cellules (DN1 et DN2) sont capables de donner les CD et les macrophages thymiques (Wada et al., 2008). Le CLP, quant à lui, génère très peu de cellules Mac1⁺

et beaucoup de lymphocytes B (Karsunky et al., 2008; Kondo et al., 1997). Ces données consolident ainsi l'hypothèse que le CLP ne serait pas à l'origine de la population DN1.

De plus, suite à l'analyse du sang de souris sauvage, les CLP ne sont pas détectés alors que le sang est une voie de passage obligatoire pour coloniser le thymus (Schwarz and Bhandoola, 2004).

Quelques années après, l'équipe d'I.L. Weissman a repositionné le CLP comme étant la source majeur du lignage T.

- Après avoir isolé et greffé différentes populations (en testant plusieurs marqueurs), une population $\text{Lin}^-\text{Flt3}^+\text{CD27}^+$ a été identifiée comme contenant le plus d'activité T et, est majoritairement constituée de CLP et MPP (Serwold et al., 2009).
- Suite à des expériences de transplantations des CLP et MPP dans des souris sub-létalement irradiées, l'analyse des thymus démontre que les CLP, à J7 post-greffe, donnent des thymocytes mais pas de DP alors que les MPP ne génère pas de cellules ; à J14 les CLP donnent beaucoup plus de DP que les MPP. A J21 les deux types de progéniteurs donnent autant de DP et à J28 la tendance s'inverse. En effet, il y a une diminution du pourcentage de DP obtenues suite à l'injection des CLP alors que les MPP en donnent toujours autant.

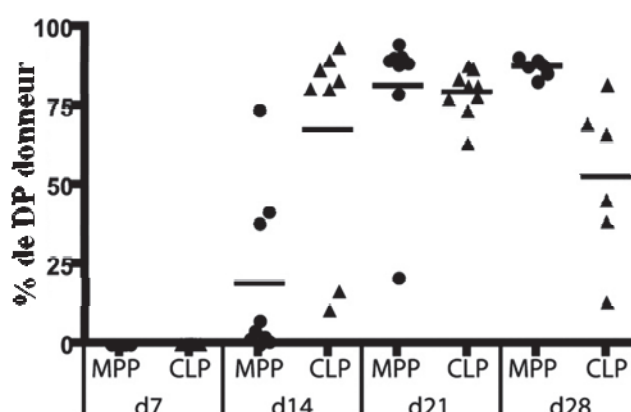


Figure 9 : Pourcentage de thymocytes DP provenant des progéniteurs donneurs (Serwold et al., 2009).

Le graphe montre le pourcentage de DP provenant de l'injection de MPP (rond) ou de CLP (triangle) à différents temps de cinétique post-injection (7, 14, 21 et 28 jours). A J14 et J28, les différences sont significatives.

Ces expériences permettent ainsi de constater que les CLP donnent des DP plus rapidement que les MPP mais que ces derniers persistent plus longtemps : les MPP se différencieraient en progéniteurs (certainement des CLP) qui eux coloniseraient le thymus (d'où le délai de colonisation et la persistance de DP J28 post greffe car les MPP sont encore un peu douée d'auto-renouvellement). Après greffe de MPP, des CLP sont détectés confortant l'hypothèse que les MPP doivent se différencier en CLP avant colonisation du thymus (Serwold et al., 2009). Le problème ici est que les auteurs se sont intéressés uniquement aux MPP en général et non aux diverses sous-populations qui comme je l'ai démontré auparavant ont des potentialités très différentes (cf. figure 4). Ceci expliquerait facilement le délai de colonisation du thymus car les MPP3 (biaisé lymphoïde) sont minoritaires dans la MO et il est donc nécessaire suite à une greffe de MPP totale d'attendre un délai pour les obtenir. De la même façon, ils auraient du étudier, suite à la greffe des MPP, la présence des différentes sous-populations de MPP en plus de celle des CLP.

Parmi le large éventail d'articles concernant le sujet controversé qu'est la potentialité T du CLP, je vous en ai présenté quelques uns qui me semblent les plus représentatifs.

D) Les cellules matures

1) La lignée myéloïde

La découverte du CLP a suggéré l'existence d'un progéniteur myéloïde commun (CMP). Comme l'expression de l'IL7R α marque le CLP et les autres progéniteurs lymphoïdes, Akashi et al. ont cherché le CMP dans la fraction IL7R α^- de la MO et ont constaté que le potentiel myéloïde était contenu dans les cellules de phénotype Lin $^-$ Sca1 $^-$ c-Kit $^+$ IL7R α^- . Par la suite, l'expression du Fc γ R (récepteur au Fc γ qui est un marqueur important des cellules myéloïdes permettant la phagocytose) et de CD34 (marqueur des CSH) a permis la mise en évidence de 3 sous-populations de progéniteurs myéloïdes (*in vitro* et *in vivo*).

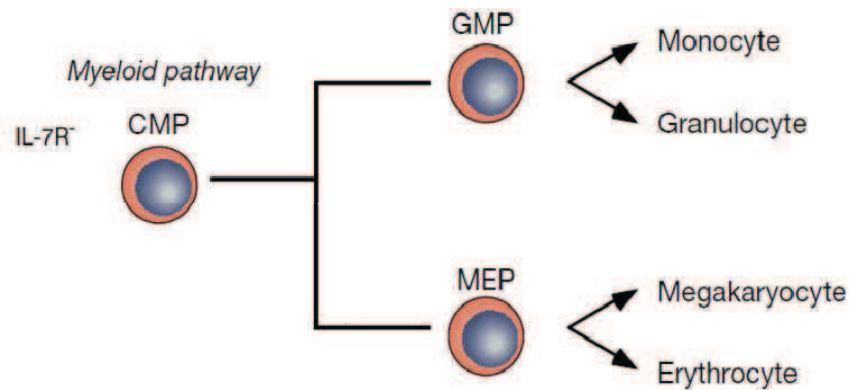


Figure 10 : Les différents progéniteurs de la lignée myéloïde et leur devenir (adapté (Akashi et al., 2000)).

Les 3 sous-populations sont ainsi : - $Fc\gamma R^{lo}CD34^+$ donnant toutes les cellules myéloïdes (CMP),

- $Fc\gamma R^{lo}CD34^-$ donnant les mégakaryocytes et les érythrocytes (MEP : progéniteurs méga-érythrocytes),

- $Fc\gamma R^+CD34^+$ donnant les macrophages et les granulocytes (GMP : progéniteurs macrophages-granulocytes).

De plus, les auteurs n'ont détecté aucune activité T ou B à la suite de la greffe de ces précurseurs et ont également constaté que le CMP (comme le CLP) avait une capacité d'auto-renouvellement limitée car 4 semaines après injection ces différents progéniteurs ne généraient plus de cellules (Akashi et al., 2000).

Depuis, comme il a été démontré précédemment (figure 4), la séparation entre le lignage lymphoïde et myéloïde est beaucoup moins drastique que ce qui était pensé à l'époque de la découverte du CMP (et du CLP). En effet, le potentiel myéloïde est perdu de façon graduelle puisque les MPP1 génèrent le CMP (qui donne lui-même comme décrit ci-dessus le GMP ou GM et le MEP ou MegE) et les MPP2 le GMP (Lai and Kondo, 2006; Lai et al., 2005).

La différenciation des cellules myéloïdes, comme toutes les cellules du système immunitaire (sauf les lymphocytes T), se fait dans la MO. Une fois matures, les différentes cellules myéloïdes peuvent alors circuler à la recherche d'un antigène.

2) La lignée des lymphocytes B

La différenciation des cellules B a été très bien caractérisée et comprend plusieurs stades de développement. En effet, différents groupes de précurseurs expriment le marqueur des cellules B, B220. Ces différentes sous-populations de progéniteurs localisées dans la MO ont été définies selon l'expression de marqueurs phénotypiques (CD19, CD43 et CD24) mais aussi selon l'avancement du réarrangement des gènes qui codent pour le récepteur des cellules B (BCR ou immunoglobuline) (Hardy et al., 1991). En effet, le réarrangement de ces gènes est une étape importante dans le développement des lymphocytes B et est très régulé (se déroule dans un ordre précis).

Les cellules B quittent alors la MO pour aller dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) où elles pourront entrer en contact avec des antigènes.

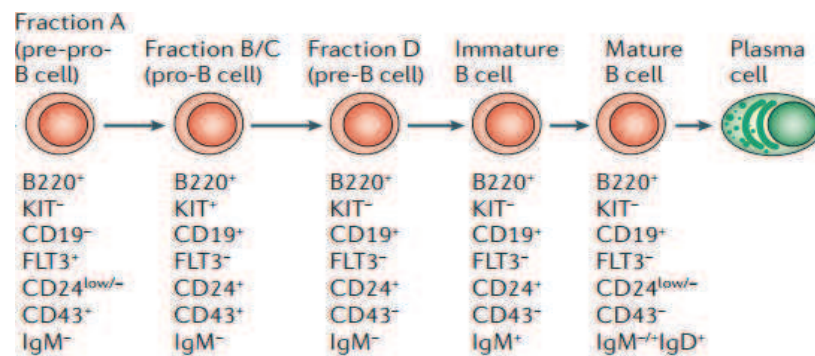


Figure 11 : Les différents stades de développement des lymphocytes B (Nagasawa, 2006).

Grâce à l'expression de différents marqueurs de surface et aux réarrangements du BCR, les progéniteurs B ont été subdivisés en différents sous-groupes : des cellules pré-pro B, des pro-B, des pré-B puis des cellules B immatures et enfin des lymphocytes B matures.

3) La lignée des lymphocytes T

Le développement et la maturation des cellules T se fait dans le thymus (contrairement aux autres lignées sanguines), suite à l'entrée d'un progéniteur, toujours méconnu, provenant de la MO.

a) La structure du thymus

Le thymus est constitué de deux lobes reliés. Chaque lobe comprends deux régions : une partie centrale appelé médulla et une partie périphérique le cortex. Plusieurs types cellulaires différents composent l'architecture du thymus : des macrophages, des cellules dendritiques et majoritairement des cellules épithéliales thymiques médullaires (dans la médulla) ou corticales (dans le cortex). Ces cellules épithéliales sont des composants essentiels du thymus qui permettent le développement des cellules T. Grâce aux vaisseaux sanguins et aux vaisseaux lymphatiques efférents qui se situent au niveau de la jonction cortico-médullaire, les progéniteurs lymphoïdes peuvent entrer dans le thymus et les lymphocytes T matures sortir (Rodewald, 2008).

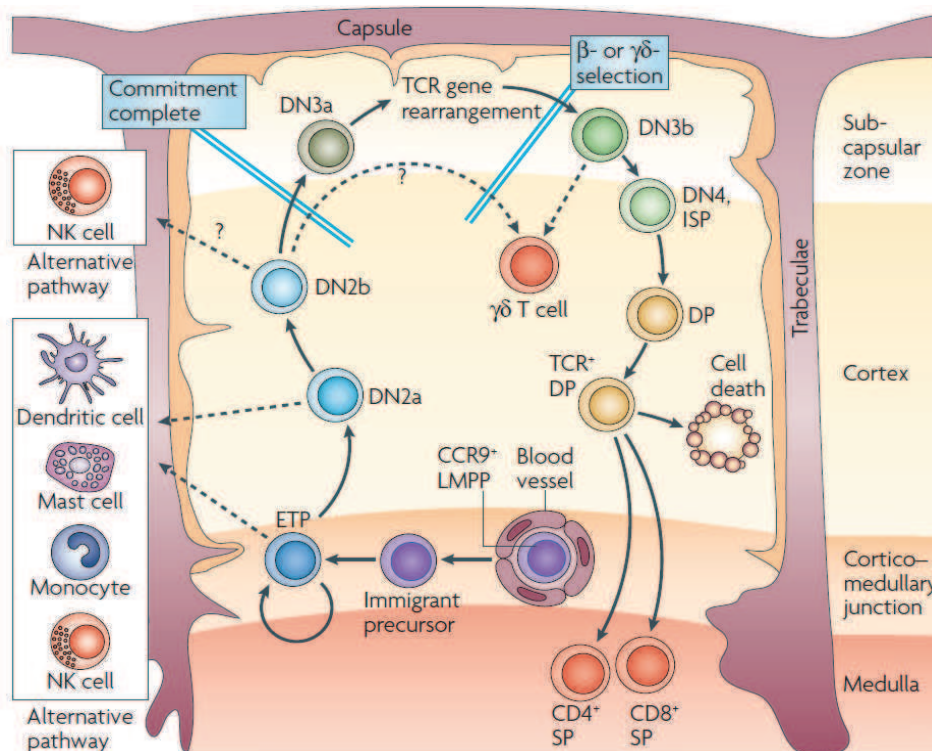


Figure 12 : La différenciation des cellules T dans le thymus (Rothenberg et al., 2008).

Une fois entré via les vaisseaux sanguins au niveau de la jonction cortico-médullaire, le précurseur va subir plusieurs étapes de maturation en circulant au travers du thymus pour donner des lymphocytes T matures qui sortiront du thymus *via* les mêmes vaisseaux.

b) Le développement intra-thymique

Les thymocytes sont dits triples négatifs (TN) car ils n'expriment pas les marqueurs des cellules T matures (CD8, CD4 et CD3) (ou comme dans la figure 11, DN pour double négatifs : $CD8^-CD4^-$). Les TN ont ainsi été subdivisés en 4 sous-populations selon leur degré de maturation grâce à l'expression des marqueurs CD44 (molécule d'adhésion) et CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL2) (Godfrey et al., 1993). Les plus immatures sont les TN1 (aussi appelé ETP) qui vont ainsi donner des TN2, puis des TN3 et enfin des TN4. Pendant cette maturation, ces cellules vont perdre leur potentiel de développement en lignées non-T, et gagner les caractéristiques des lymphocytes T. En effet, entre le stade TN2 et TN3 les cellules seront complètement engagées vers la lignée T, et vont commencer à réarranger les gènes des $TCR\gamma$, $TCR\delta$ et $TCR\beta$. Les cellules non engagées dans la lignée $\gamma\delta$ exprimeront ensuite les 2 corécepteurs CD4 et CD8 pour devenir des cellules doubles positives (DP : $CD4^+CD8^+$) et réarranger le $TCR\alpha$. Après sélection (positive et négative) du $TCR\alpha\beta$, ces DP se différencient en cellules T matures dites simples positives (SP) qui expriment soit CD8 soit CD4 (Rothenberg et al., 2008).

II. Les précurseurs T extra-thymiques

Il existe également des progéniteurs restreints à la voie T en dehors du thymus : ce sont les précurseurs T extra-thymiques. Plusieurs précurseurs (partageant l'expression de Thy1 et CD44) ont ainsi été identifiés dans différents organes lymphoïdes : la MO, le sang, l'intestin et la rate. Ils doivent ensuite coloniser le thymus afin d'y terminer leur développement en cellules T matures. Il est alors logique de penser que ces cellules contribuent au développement T en contournant les premières étapes de différenciation intra-thymique (ces précurseurs sont proches des stades thymiques TN2 / TN3).

A) La moelle osseuse

L'équipe de S. Strober, en 1999, a mis en évidence une population de cellules restreintes à la lignée T dans la MO (Dejbakhsh-Jones and Strober, 1999).

Dejbakhsh-Jones et al. ont pu identifier des précurseurs CTP (committed T cell progenitors) de phénotype $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+ \text{CD44}^+ \text{CD16}^+ \text{CD2}^-$. Ces cellules sont capables de générer des cellules T suite à des expériences de greffe et en culture. En effet en culture (en présence de cellules de MO déplétées en lymphocytes T) elles sont capables de se développer en DP en 44h puis en SP $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+$ ou CD8^+ en 48h. Au cours de la culture les CTP acquièrent l'expression de CD2 et perdent celles de CD44 et CD16. Par contre si des lymphocytes T matures sont ajoutés à la culture, la différenciation est inhibée et plus particulièrement la transition de $\text{TCR}\alpha\beta^-$ à $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (Dejbakhsh-Jones and Strober, 1999).

Greffés, les CTP génèrent des cellules $\text{TCR}\alpha\beta^+$ mais pas de cellules B (B220), NK (NK1.1) ou myéloïde (Gr1 et Mac1). Dans ces conditions, le thymus est moins reconstitué que la périphérie. En effet, le nombre absolu de cellules T donneur dans l'hôte est environ 40 fois plus faible que dans une souris sauvage alors que dans la MO il est 10 fois plus important (suggérant ainsi que la maturation peut se faire en dehors du thymus ou que sa colonisation est très rapide). Les CTP n'ont fait aucun réarrangement du TCR (par PCR) mais expriment Rag1, Rag2 et pT α (par RT-PCR) (Dejbakhsh-Jones et al., 2001).

Le CTP est détecté dans la MO de souris athymiques mais n'est pas fonctionnel (du à une mutation de FoxN1, essentielle à la maturation des cellules épithéliales chez la souris nu/nu (nude)). En effet, le nombre de CTP dans ces souris est très réduit dû à une diminution des cellules en cycles (BrdU) et à une augmentation de l'apoptose (annexine V et iodure de propidium)). De plus, ces CTP n'expriment pas pT α et ne sont pas capables de reconstituer le compartiment T lors d'expériences de greffe (Chatterjea-Matthes et al., 2003). Par contre, les CTP greffés dans des souris athymiques (nu/nu) génèrent des cellules T qui sécrètent de l'interféron γ (après stimulation *in vitro*) et protègent les souris receveuses contre l'infection létale avec le

CMV murin. Le CTP peut donc générer des lymphocytes T fonctionnelles par une voie extra-thymique (Garcia-Ojeda et al., 2005).

Les CTP sont des progéniteurs T qui expriment des gènes spécifiques de la lignée T et sont capable de générer des lymphocytes T mature par une voie extra-thymique. Mais, les CTP ne peuvent pas être générés dans des souris *nu/nu* à cause (selon les auteurs) de l'effet de la mutation *FoxN1* sur le microenvironnement de la MO ce qui a été conforté par des injections de CSH dans des souris thymectomisées qui ont réussi à donner des CTP. Il serait donc intéressant de confirmer et de déterminer en quoi la mutation de *FoxN1* rend l'environnement de la MO de souris nude anormale (surtout lorsqu'on prend en compte le fait que ces souris n'ont pas de défaut apparent dans les cellules progénitrices de la MO). Il faut aussi s'assurer de la pureté du tri fait car il peut y avoir une contamination provenant de cellules T matures ($CD4^+$) présentes dans la MO.

B) Le sang

Plus récemment, l'équipe d'H. Von Boehmer a mis en évidence une population de précurseurs restreints à la lignée T dans le sang de souris transgéniques qui expriment le CD25 humain (hCD25) sous le contrôle du promoteur de pT α (Krueger and von Boehmer, 2007).

Dans la circulation les auteurs ont retrouvé 0,06% de cellules Lin^-hCD25^+ dont quelques unes expriment B220 : les $Lin^-hCD25^+B220^+$ sont $c-Kit^-IL7R\alpha^-Flt3^-Sca1^+CD44^+Thy1.1^{+/-}$ alors que les $Lin^-hCD25^+B220^-$ sont $c-Kit^+IL7R\alpha^+Flt3^{-/lo}Sca1^+CD44^+Thy1.1^+$. Après 18 jours en co-culture sur OP9-DL1, seules les cellules $B220^-$ donnent des lymphocytes T et sur OP9 elles donnent des cellules NK et B (et pas de cellules T ce qui suggère que ces précurseurs ont besoin de Notch pour se différencier). Le potentiel des $Lin^-hCD25^+B220^-$ de générer des lymphocytes T est beaucoup plus grand que celui de donner des cellules B et NK d'où son nom de CTP (circulating T cell progenitor). Cette population ne fait aucune colonie en culture sur

méthylcellulose et n'a donc pas de potentiel myéloïde. Cependant, les CTP sont bipotents T et NK (démonstré *in vivo*). Ils expriment le ligand à la P-sélectine et CCR9 (qui sont des protéines facilitant l'entrée au thymus).

Les CTP sont aussi retrouvés dans des souris athymiques (*nu/nu*) (dans des proportions similaires aux souris sauvages) et sont fonctionnels (donnent des DP sur OP9-DL1) contrairement aux CTP de la MO. Ceci indique donc que les CTP ne dérivent pas du thymus. L'inhibition de Notch dans les cellules Lin⁻ de la MO des souris transgéniques hCD25 (grâce à un rétrovirus exprimant un dominant négatif d'un co-activateur de Notch (mastermind like 1) entraîne une réduction du nombre d'ETP. Cependant le nombre de CTP est normal indiquant qu'ils n'ont pas besoin de Notch pour leur génération mais seulement pour donner des cellules T matures (Krueger and von Boehmer, 2007).

Cette population de cellules semble donc bien être des précurseurs générant des lymphocytes T mature qui ne proviennent pas de fuites des thymocytes du thymus (Lambolez et al., 2006) car ils sont présents dans des souris nude. Par contre, ces cellules ont été identifiées dans des souris transgéniques et pour être validée cette étude doit être réalisée dans des souris sauvages.

C) L'intestin

Les lymphocytes T intra-épithéliaux (LIE) de l'intestin permettent de protéger la muqueuse intestinale contre les antigènes exogènes. Dans la souris normale, 50% des LIE de l'intestin grêle ont un phénotype identique aux lymphocytes T périphériques TCR $\alpha\beta$ ⁺Thy1⁺ (CD8 $\alpha\beta$ ⁺ ou CD4⁺) et 50% sont CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ (TCR $\alpha\beta$ ⁺ ou TCR $\gamma\delta$ ⁺) et sont appelés LIE non conventionnels. Dans la souris athymique, les LIE sont majoritairement CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺. Ces derniers auraient donc une origine extra-thymique (Rocha et al., 1995).

L'équipe d'H. Ishikawa a donc cherché à identifier un progéniteur des LIE non conventionnels dans l'intestin. Par des sections du tube gastro-intestinal et une

coloration éosine/hématoxyline, de nombreux petits agrégats d'environ 1 000 cellules lymphoïdes ont été mis en évidence (dans le petit et le gros intestin). Ces clusters sont situés au niveau des cryptes intestinales et sont ainsi nommés cryptoplaques (CP). La majorité de ces cellules (70%) sont des cellules Lin⁻ et expriment c-kit, IL-7R et Thy1. De plus, par immunohistochimie, ils ont pu démontrer que 30% des cellules des CP sont des cellules dendritiques (CD11c⁺) localisées en périphérie de ces cellules Lin⁻. Les CP commencent à être détectées à partir de 14 jours après la naissance et sont maintenues (en nombre et en cellularité) chez des souris âgées (114 semaines). De plus, elles sont retrouvées dans plusieurs souris mutantes dont des souris athymiques (*nu/nu*), mais sont absentes des souris IL-7R^{-/-} suggérant un rôle important des signaux médiés par l'IL-7 pour l'existence de ces structures ou des cellules les composant (Kanamori et al., 1996).

Saito en 1998 a réalisé des expériences de greffe des précurseurs (Lin⁻c-Kit⁺) des CP provenant de souris nude à des receveurs immunodéficients (SCID : severe combine immunodeficient) irradiés. Ces cellules ont généré des LIE CD8αα⁺TCRαβ⁺ et TCRγδ⁺ mais aucune cellule B. Ceci suggère que les cellules présentes dans les CP sont les précurseurs des LIE non conventionnels indépendants du thymus (Saito et al., 1998).

De même, Lambolez et al. ont montré que l'injection des précurseurs (Lin⁻c-Kit⁺) des CP de souris normales dans des souris Rag2^{-/-}γc^{-/-} thymectomisées et irradiées entraîne la production des LIE CD8αα⁺TCRαβ⁺ et TCRγδ⁺. Ces différents travaux ont ainsi permis de mettre en évidence un lien direct entre les précurseurs trouvés dans les CP et les LIE non conventionnels. De plus, l'analyse de l'expression génique montre l'engagement T des précurseurs des CP (très peu de cellules expriment l'ARNmessenger (ARNm) de CD3ε (6%), Rag1 (5%) et pTα (2%)) (Lambolez et al., 2002). On peut ainsi penser que soit les précurseurs présents dans les CP sont très immatures, soit représentent une faible fraction des cellules.

Il a été démontré que le thymus exporte non seulement des cellules matures mais aussi des thymocytes immatures qui quittent le thymus avant d'avoir réarrangé leur TCR (Lambolez et al., 2006). Plus précisément une population de thymocytes immatures

(TN $CD44^+CD25^{int}$) peut quitter le thymus, migrer dans le sang et coloniser l'intestin. La greffe de ces cellules conduit à la génération de tous les LIE dans des souris athymiques. Ceci prouve donc que l'intestin est un organe lymphoïde primaire au sein duquel des précurseurs peuvent réarranger leur TCR et s'engager vers le lignage $TCR\alpha\beta$ ou $TCR\gamma\delta$ (Peaudecerf et al., 2011). Ceci confirme que des précurseurs T dans l'intestin peuvent se différencier *in situ* afin de donner des LIE matures.

D) La rate

L'équipe de S. Ezine, en 2002, a mis en évidence l'existence de précurseurs restreints à la lignée T dans la rate (Lancrin et al., 2002).

Ces derniers de phénotype Lin^-Thy1^+ ont, dans un premier temps, été identifiés au niveau de colonies spléniques 12 jours (SC12) après injection de MO dans des souris irradiées létalement. L'expression de CD44 a permis de définir deux groupes : environ la moitié de ces précurseurs sont $CD44^-$. Les cellules Lin^-CD44^+ expriment peu de CD3 ϵ (1,3%) et encore moins de pT α alors que les précurseurs Lin^-CD44^- expriment quasiment tous CD3 ϵ et 7,6% pT α . De plus, ces derniers ont commencé le réarrangement du TCR β contrairement au Lin^-CD44^+ (aucune des deux populations n'a réarrangé le TCR α). Ceci indique que la population Lin^-CD44^- contient des cellules pré-T. Suite à des injections intra-thymiques dans des souris sub-létalement irradiées (600rad), les deux populations sont capables de générer des cellules T mais avec une cinétique de reconstitution différente. En effet, les Lin^-CD44^- sont plus rapide à donner des DP mais elles ont un potentiel d'expansion plus faible que les Lin^-CD44^+ . Ces deux populations colonisent le thymus et le reconstituent suite à des greffes à des souris irradiées sub-létalement. Les précurseurs $CD44^+$ génèrent des cellules B et NK mais pas les $CD44^-$. Aucune des deux populations ne génèrent de cellules myéloïdes *in vivo* (très peu de colonies *in vitro* en cultures sur méthylcellulose). Enfin, suite à des injections intra-thymiques des cellules provenant de donneurs sauvages ou athymiques, il n'y a aucune différence de potentialité démontrant que le thymus

n'influence pas l'engagement T de ces progéniteurs. De plus, les cellules Lin⁻CD44⁺ sont les plus immatures (génération de T, B et NK) mais les Lin⁻CD44⁻ produisent des cellules T plus rapidement (et pas de B ou NK) (Lancrin et al., 2002).

Afin de confirmer que le thymus n'influence pas l'engagement T de ces précurseurs, le profil d'expression de différents gènes (CD3ε, Gata3, Rag1 et pTα important pour la lignée T) a été étudié dans les cellules Lin⁻CD44⁻ (obtenues de souris athymiques ou sauvages). Chez les souris athymiques, CD3ε (67,5% *versus* 96,4%) et Gata3 (42,5% *versus* 70,6%) diminue légèrement démontrant ainsi que l'influence du thymus n'est pas requise pour l'engagement T mais qu'il augmente l'expression des gènes T spécifiques. Suite à l'injection de ces précurseurs dans des souris athymiques, aucune cellule T mature n'a été détectée, mais après 4 semaines (post-greffe) quelques cellules TCRγδ⁺ ont été retrouvées dans l'intestin. Ces précurseurs ont donc besoin de signaux du thymus ou de l'épithélium intestinal pour se différencier en lymphocyte T. Suite à la comparaison phénotypique de plusieurs marqueurs comme c-Kit, les cellules Lin⁻CD44⁻ ne sont identiques à aucune population TN (cependant certains marqueurs sont communs). Suite à des expériences de greffe intra-thymique de souris irradiées sub-létalement, les cellules Lin⁻CD44⁻ donnent des DP et des SP plus tardivement que les TN (TN3 et TN4) et ont un potentiel d'auto-renouvellement limité (11 jours post-greffe il n'y avait plus de cellule donneur). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* (culture sur OP-DL1). Afin d'être en condition plus physiologique, ces précurseurs ont été greffé (en circulation) et ont alors acquis des capacités d'expansion et d'auto-renouvellement qui n'existaient pas lors de l'injection intra-thymique. Ainsi, les cellules Lin⁻CD44⁻ sont engagées dans la lignée T sans l'influence du thymus mais pour leur différenciation en lymphocytes, elles ont besoin de ces signaux (Arcangeli et al., 2005).

Ces précurseurs T de la rate (Lin⁻Thy1.2⁻CD44⁺ multipotents et Lin⁻Thy1.2⁺CD44^{-/lo} restreints T) sont retrouvés dans les souris receveuses avant l'émergence des ETP dans le thymus (2 semaines contre 3 post-greffe respectivement) (Maillard et al., 2006). Ceci indique que les précurseurs T extra-thymiques peuvent contribuer à la reconstitution du compartiment ETP après greffe de MO.

Des cellules $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$, dont la majorité exprime CD25, CD44 et l'IL7R α , ont été identifiées dans la rate (et le sang) de souris B6 (non manipulées) mais aussi de souris nude athymiques. Dans ces dernières (et les souris thymectomisées), la population $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ est beaucoup plus abondante que dans la rate de souris B6 démontrant ainsi que ces cellules y sont retenues en absence de thymus. L'étude de différentes souris immuno-déficientes et l'absence de cellules $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ des souris Rag2 $^{-/-}$, Rag2 $^{-/-}$ $\gamma\text{c}^{-/-}$ et IL7 $^{-/-}$, démontre l'importance de l'IL7 et de la machinerie Rag dans la génération de ces dernières (Gautreau et al., 2007).

La greffe de cellules $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ (dans le thymus ou la circulation) ne donnent ni cellules myéloïdes ni B ni NK. Leur greffe dans des souris thymectomisées CD3 $\epsilon^{-/-}$ n'entraîne la génération d'aucune cellule mis à part quelques LIE démontrant ainsi la nécessité de ces cellules de coloniser le thymus pour donner des cellules T matures. *In vitro*, sur OP9-DL1, les précurseurs $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ se développent plus lentement et donnent moins de cellules que les TN3. Enfin, environ 10% des $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ expriment CCR9 (chemokine receptor 9) et une majorité de ces précurseurs l'expriment dans le sang de souris sauvage contre 2% dans la souris nude. Ainsi ces précurseurs CCR9 $^+$ semblent être retenus dans la rate en absence de thymus (Gautreau et al., 2007) ou ont besoin de signaux provenant du thymus pour l'exprimer.

Pour terminer, le rôle de Notch dans la génération de ces précurseurs T de la rate a été étudié. Pour cela, des transplantations de cellules de MO provenant de souris Notch1 $^{-/-}$, Notch2 $^{-/-}$ et Notch1 $^{-/-}$ Notch2 $^{-/-}$ (réalisé en utilisant le système Cre-Lox) ont été effectuées. A J12 post-greffe, les cellules Thy1.2^+ sont identifiés dans les souris ayant reçu une greffe de MO provenant de souris Notch1 $^{-/-}$ et Notch2 $^{-/-}$ (identique au contrôle) alors que celles ayant reçu la MO Notch1 $^{-/-}$ Notch2 $^{-/-}$ ne contiennent aucun précurseur. Ces résultats permettent ainsi de démontrer que les précurseurs T spléniques ont besoin de la signalisation Notch1 ou Notch2 pour leur génération (Besseyrias et al., 2007).

Les cellules $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ représentent une population de précurseurs engagés vers la lignée T ne nécessitant pas de thymus pour leur génération mais dépendant de la signalisation Notch. Pour donner des lymphocytes T matures, ces dernières doivent

coloniser le thymus en rentrant directement à un stade TN3 dont elles sont très proches. En effet la présence de DL1 dans la rate assure le maintien des précurseurs T spléniques et seul DL4, présent dans le thymus, pourra permettre la maturation finale en cellules T matures. Ces cellules représentent ainsi un pool capable de générer rapidement des T matures.

Il existe ainsi plusieurs populations de précurseurs engagés dans la lignée T avant leur passage dans le thymus démontrant ainsi que plusieurs types cellulaires peuvent coloniser ce dernier. Ces différents précurseurs pourraient donc constituer des compartiments de réserve surtout sollicités en cas de lymphopénie qui permettraient ainsi une génération de lymphocyte T mature plus rapide que celle réalisée par les progéniteurs de la MO. Dans des conditions homéostatiques, ces cellules pourraient aussi faire partie d'un pool de précurseurs T colonisant le thymus en se greffant au niveau des différentes étapes du développement (entre TN2 et TN3) dans le thymus.

III. Les facteurs impliqués dans la différenciation hématopoïétique

La maturation des CSH dans les différents lignages hématopoïétiques (lymphoïde ou myéloïde) ainsi que le maintien des fonctions des CSH (auto-renouvellement et multipotentialité) dépendent de différents facteurs. L'expression de gènes spécifiques de lignée codant pour des facteurs de transcription et des protéines de surface est responsable du choix vers une voie spécifique de différenciation. Cette expression est régulée par l'état de la chromatine (du à des modifications post-traductionnelles des histones qui lient l'ADN). En effet, cette dernière peut être soit ouverte ou décondensée (euchromatine) ce qui permettra alors l'accès à la machinerie de

transcription soit fermée ou condensée (hétérochromatine) empêchant ainsi l'expression du gène (Martin and Zhang, 2005).

A) Gata2 : impliqué dans le maintien des CSH

GATA-2 fait partie de la famille GATA des facteurs de transcription à doigt de zinc reconnaissant une séquence consensus GATA sur leurs gènes cibles. Cette famille est composée de GATA-1, -2 et -3 qui ont un rôle dans le destin cellulaire et sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques à différents stades.

Les CSH LSK CD34⁻ sont diminuées de moitié dans les souris GATA-2^{+/-} et leur capacité à repeupler un animal irradié est aussi diminué (Rodrigues et al., 2005).

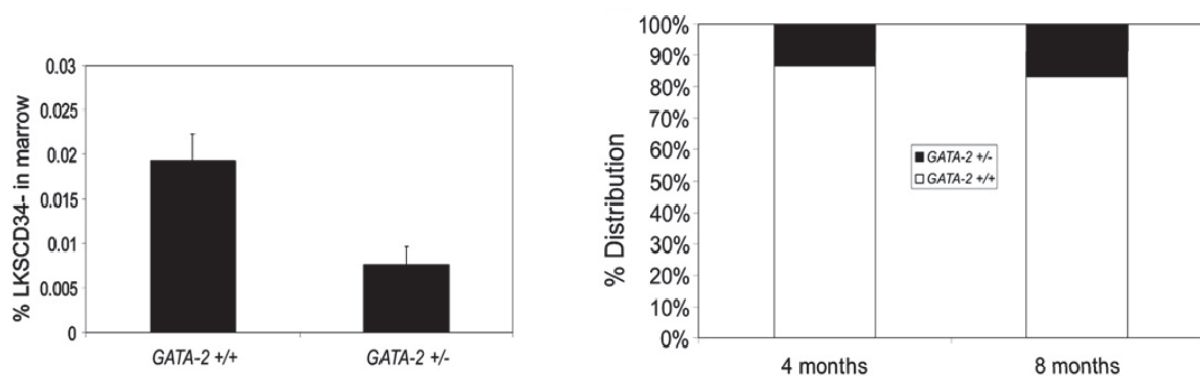


Figure 13 : Influence de Gata2 sur les CSH (Rodrigues et al., 2005).

A gauche, le pourcentage de LSK CD34⁻ dans des souris Gata2^{+/+} versus Gata2^{+/-}. A droite, la transplantation des cellules de ces dernières souris en compétition avec des progéniteurs provenant de Gata2^{+/+} démontre que les CSH Gata2^{+/-} sont altérées dans leur capacité de repopulation.

Ces résultats ne sont pas dus à des anomalies de prolifération (test Hoechst sur l'ADN, la proportion des cellules en phases S/G₂/M inchangée) mais à une augmentation par environ deux du nombre de cellules quiescentes (test Pyronine). Cependant, après test au 5-FU (entraînant l'apoptose des cellules en cycle), les CSH GATA-2^{+/-} cyclent environ deux fois moins que celles de souris sauvage. Enfin, des expériences de transplantation en série ont démontré que l'auto-renouvellement des CSH GATA-2^{+/-}

était normal (Rodrigues et al., 2005). Ceci implique donc Gata2 dans le maintien et l'homéostasie des CSH.

B) Gata3 : un rôle dans les CSH et gène clé de l'engagement T

GATA-3 est un autre des membres de la famille GATA des facteurs de transcription à doigt de zinc. Comme Gata2 (Tsai et al., 1994), la délétion de Gata3 est létale au stade embryonnaire (entre 10 et 12 jours post fécondation) indiquant leurs rôles important dans le développement (Pandolfi et al., 1995). Les études sur ces gènes doivent donc se faire dans des souris hétérozygotes ou dans des délétions inducibles ou cellules spécifiques.

Les CSH expriment Gata3 autant que les ETP suggérant ainsi un rôle potentiel de ce facteur de transcription dans les CSH (Buza-Vidas et al., 2011).

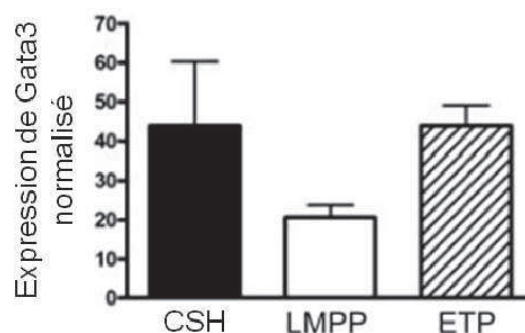


Figure 14 : Expression de Gata3 dans les CSH, LMPP et ETP par micro-array (Buza-Vidas et al., 2011).

L'expression de Gata3 est diminuée dans les LMPP comparativement aux CSH pour être augmenté au stade ETP.

En utilisant des souris $Gata3^{fl/fl}$ croisées avec des souris Vav-iCre, l'expression de Gata3 a été éteinte spécifiquement dans les CSH. Aucun changement dans la cellularité de la MO n'a été constaté et le nombre de CSH dans les souris déficientes suggèrent une prolifération normale. Ces CSH mises en compétition avec de la MO sauvage ont reconstitué les compartiments B ($CD19^+$) et myéloïdes ($GR1^+Mac1^+$) mais

pas celui des lymphocytes T (jusqu'à 11 mois post-greffe démontrant ainsi que l'auto-renouvellement n'est pas affecté) (Buza-Vidas et al., 2011).

De même, dans des souris $Gata3^{fl/fl}$ où la délétion est induite par l'acide poly(I:C), l'expression de $Gata3$ est diminuée (de 98,9%) et le nombre absolu de LT-CSH est réduit de façon significative (51%). $Gata3$ a ainsi un rôle dans le maintien du nombre de CSH (confirmé par des expériences de transplantation). En effet, $Gata3$ favorise l'entrée en cycle et la prolifération des CSH (BrdU, Ki67 et DAPI). Pour finir, l'expression de $Gata2$ n'est pas modifiée dans les CSH $Gata3^{fl/fl}$. Il n'y a donc pas d'effet compensatoire mais ceci n'exclut pas que $Gata2$ par son activité peut compenser la délétion (Ku et al., 2012). En effet, les mutants $Gata3$ et $Gata2$ semblent avoir des phénotypes assez similaires (diminution du nombre de CSH) qui ne sont pas non plus drastiques, c'est-à-dire que dans les deux cas il y a toujours des CSH ce qui laisse penser à une redondance entre ces deux membres de la famille GATA.

$Gata3$ est impliqué dans le maintien des CSH mais il a d'abord été étudié dans le développement des cellules T (Ting et al., 1996). Comme nous l'avons vu précédemment les CSH de $Gata3^{fl/fl}$ ne génèrent pas de lymphocytes T (Buza-Vidas et al., 2011).

Afin de mettre en évidence le rôle de $Gata3$, l'équipe de J.M. Leiden a mis au point une souris $Gata3^{+/-} Rag2^{-/-}$ (en injectant des cellules souches embryonnaires $Gata3^{+/-}$ dans des blastocystes $Rag2^{-/-}$). L'injection de ces cellules chimères a sauvé le phénotype des souris $Rag2^{-/-}$ c'est-à-dire que le développement T est normal (autant de DP et SP que le contrôle). Au contraire, en utilisant les cellules chimères $Gata3^{-/-}$, une réduction importante des thymocytes (significativement non différente des souris $Rag2^{-/-}$) et une absence totale de cellules DP et SP sont observées. $Gata3$ est ainsi le premier facteur de transcription impliqué spécifiquement dans les stades précoces de développement T car la génération des cellules B ($B220^{+}$) et myéloïdes ($Mac1^{+}$ et $Gr1^{+}$) est normale. Au vu des résultats obtenus, $Gata3$ semblerait impliqué dans la survie, la prolifération et/ou la différenciation des progéniteurs T (Ting et al., 1996).

La surexpression de $Gata3$ (par vecteur rétroviral) entraîne un blocage de la différenciation T au stade DN1 démontrant que la dose de $Gata3$ est importante pour

un développement T normal (Anderson et al., 2002). Ceci, même si un seul allèle de Gata3 est suffisant pour sauver le phénotype de souris Rag2^{-/-} (Ting et al., 1996).

De même, l'activité de Gata3 est nécessaire pour le développement des ETP thymiques embryonnaire et adulte (dans lesquels il est exprimé). En effet, les souris où Gata3 a été conditionnellement supprimé chez l'adulte génèrent moins de 3% des ETP et DN2 que les contrôles. De plus, le nombre d'ETP et DN2 générées dans des expériences de reconstitution a confirmé la contribution de Gata3 à la génération des ETP (les CSH provenant de mutants Gata3 ont contribué moins efficacement à la génération d'ETP que les cellules de souris sauvage). Ces données indiquent que Gata3 est nécessaire pour le développement d'un compartiment d'ETP fonctionnelle (Hosoya et al., 2009).

Gata3 est ainsi un gène « clef » pour le développement de lymphocytes T matures.

C) Pu1 : le gène multipotent

Pu1 est un membre de la famille Ets (E-twenty six), il partage tous un domaine de liaison à l'ADN commun (d'environ 85 acides aminés). Pu1 est un gène dont l'expression est spécifiquement restreinte aux cellules hématopoïétiques mais il est exprimé dans plusieurs types cellulaires (cellules B, myéloïdes...) d'où des rôles très différents. Afin de connaître le rôle de Pu1, plusieurs délétions ont été faites : une dont les souris mourraient avant la naissance et une autre où les souris mourraient peu après la naissance (48h) de septicémie démontrant ainsi le rôle essentiel de Pu1 dans le système immunitaire (Lloberas et al., 1999).

Afin d'étudier sa fonction, des transfections rétrovirales de Pu1 dans des progéniteurs hématopoïétiques provenant de souris Pu1^{+/-} ou Pu1^{-/-} ont été réalisées. Suite à l'infection et la mise en culture des cellules, les auteurs ont constaté qu'à différentes concentrations Pu1 régulent le développement des lymphocytes B ou des cellules myéloïdes (macrophages). En effet, une faible concentration de Pu1 induit une différenciation vers la voie B alors qu'à forte dose, il promeut la différenciation

myéloïde et bloque la lignée B (DeKoter and Singh, 2000). Les progéniteurs Pu1^{-/-} n'expriment pas l'IL7R α suggérant que Pu1 régule directement son expression. La transfection rétrovirale d'IL7R α dans des progéniteurs Pu1^{-/-} a restauré la génération de cellules pro-B démontrant ainsi la fonction de Pu1 à réguler le développement des lymphocytes B en contrôlant (entre autre) l'expression de l'IL7R α (DeKoter et al., 2002).

Il a aussi été démontré que l'expression de Pu1 (par infection virale) dans des cellules pré-T entraîne leur reconversion en cellules myéloïdes (Laiosa et al., 2006). Cet article rejoint ainsi la conclusion de DeKoter qui avait démontré qu'à forte concentration Pu1 entraînait un destin myéloïde des cellules progénitrices (DeKoter and Singh, 2000) mais rajoute qu'il peut aussi détourner des cellules déjà engagées vers une voie de différenciation (Laiosa et al., 2006).

En plus de son rôle dans le développement vers la lignée B et myéloïde, Pu1 semble aussi impliqué dans la génération des lymphocytes T. En effet, Pu1 est fortement exprimé dans les TN CD44⁺ (TN1 et 2), diminué dans les CD44⁻ (TN3 et 4) pour être éteint dans les cellules T matures. Les embryons déficients pour Pu1 ont des thymocytes bloqués avant l'engagement T (quelques thymocytes ont des marqueurs de cet engagement) et sont identiques en nombre et en marqueurs de surface à des sauvages démontrant ainsi que Pu1 est nécessaire dans le thymus et non pour sa colonisation. De plus, ces cellules sont capables de se développer en cellules T fonctionnelles (production d'IL2 après stimulation du TCR). Pu1 n'est donc pas nécessaire au développement T mais joue un rôle dans l'engagement des progéniteurs T (Spain et al., 1999).

Une dernière étude démontre que Pu1 est exprimé dans les thymocytes mais a une dose plus faible que dans les ETP. En effet, son expression est diminuée par 10 entre les stades ETP et DN2b. Cette diminution est accompagnée de celle de c-Kit dans les DN2b qui viennent de s'engager dans la voie T démontrant que cette diminution (à un seuil précis) est nécessaire à l'engagement T (Yui et al., 2010).

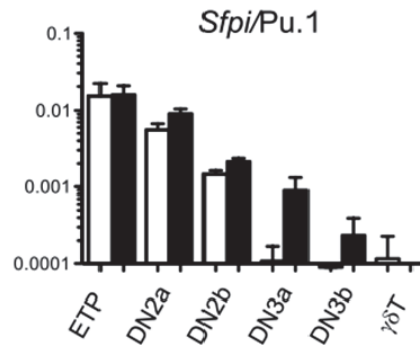


Figure 15 : Expression de Pu1 dans les thymocytes (Yui et al., 2010).

Par RT-PCR quantitative, l'expression relative de Pu1 a été étudiée dans les ETP, DN2a, DN2b, DN3a, DN3b (après la β sélection) et des lymphocytes T $\gamma\delta$. Les histogrammes noirs correspondent à l'expression dans des souris C57/Bl6 et les blancs à des souris NOD (non-obese diabetic, développant un diabète auto-immun).

Ainsi Pu1 a un rôle dans le développement des différentes lignées hématopoïétiques, la dose est alors importante pour déterminer le devenir des cellules.

D) Le gène lymphoïde E2A

E2A fait partie de la famille des protéines hélice-boucle-hélice et plus particulièrement des E-protéines qui sont des facteurs essentiels pour le développement des lymphocytes. Ces protéines fixent l'ADN sur des motifs appelé boîte E (CANNTG) sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères. L'épissage alternatif de l'ARN d'E2A conduit à deux isoformes (E12 et E47) (Engel and Murre, 2001).

Les souris déficientes en E2A ont un blocage dans le développement B avant le réarrangement des immunoglobulines et l'expression de B220. Grâce à l'étude des souris hétérozygotes ($E2A^{+/-}$), un effet dose-dépendant de E2A a été observé car dans ces dernières le nombre de cellules B est diminué d'environ la moitié par rapport à une souris sauvage (Zhuang et al., 1996).

Des progéniteurs Lin^- provenant du foie fœtale d'embryons $E47^{-/-}$ (à E15,5) transduits avec EBF retrouvent la possibilité de se développer dans le lignage B ($CD19^+B220^+$) démontrant qu'EBF est la cible principale d'E2A. En effet EBF est suffisant pour

promouvoir l'expression des gènes impliqués dans le développement B et permettre le réarrangement des immunoglobulines (Seet et al., 2004).

Afin de connaître son rôle dans le développement T, des gènes associés à ce lignage ont été étudiés et l'isoforme E47 d'E2A active des gènes tel que Hes1 (cible direct de Notch1), pTα, Notch1 ou encore l'IL7Rα. Ces gènes étant aussi activés par Notch1, l'équipe de C. Murre a examiné si la signalisation Notch1 et E47 agissent en synergie. Suite à la culture (en présence ou absence de DL1) de cellules progénitrices E2A^{-/-} transfectées avec E47, ils ont pu démontrer qu'E47 et Notch1 en agissant ensemble augmentent l'expression de certains gènes comme pTα ou ne la change pas comme pour Hes1. Ceci démontre donc qu'E2A agit avec Notch1 pour promouvoir la maturation dans le lignage T (Ikawa et al., 2006).

Il est connu qu'après la β-sélection, et donc la formation du pré-TCR, il y a une diminution de Notch1 (au stade TN3 où sa signalisation n'est plus nécessaire). Cette dernière est due à une inhibition d'E2A par Id3 (inhibitor of DNA binding). En effet, la signalisation du pré-TCR induit Id3 qui va bloquer l'activité d'E2A. Ce dernier ne pourra plus réguler la transcription de Notch1 (Yashiro-Ohtani et al., 2009). Ces données démontrent ainsi le rôle de co-régulateur d'E2A (avec Notch1) de la signalisation Notch1.

De plus, la délétion d'E2A entraîne une diminution significative du nombre de LMPP démontrant son rôle dans leur génération. Au regard du phénotype des souris hétérozygotes, E2A joue aussi un rôle dose-dépendant dans la génération des LMPP. La réduction du nombre de LMPP souligne la déficience observée dans le compartiment lymphoïde (Dias et al., 2008).

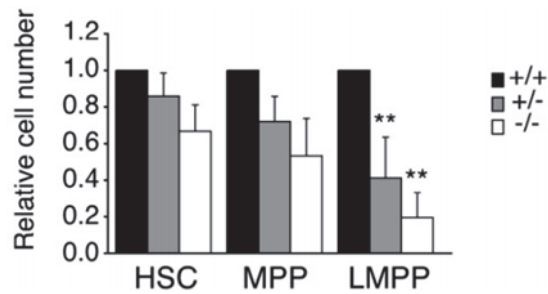


Figure 16 : Nombre relatif d'HSC, MPP et LMPP dans des souris E2A^{+/+}, E2A^{+/-} et E2A^{-/-} (Dias et al., 2008).

Le nombre de HSC, MPP et LMPP dans les souris E2A^{+/-} (histogramme gris), E2A^{-/-} (blanc) relatif au sauvage E2A^{+/+} (noir) qui correspond à 1.

E2A a donc un rôle important dans la génération des cellules impliquées dans le lignage lymphoïde et plus particulièrement dans le développement de cellules B.

E) L'IL7R et son rôle dans le lignage lymphoïde

Le récepteur à l'IL7 est retrouvé à la surface des cellules hématopoïétiques à partir du stade MPP3. Il est composé de deux sous unités : la chaîne α du récepteur à l'IL7 (IL7R α) et la chaîne γ c commune avec d'autres récepteurs aux interleukines (Noguchi et al., 1993).

Les souris déficientes pour l'IL7R ont une profonde réduction dans leur cellularité thymique (1% du nombre de cellules d'une souris normale) et en périphérie (environ 90% de diminution des cellules T dans la rate). De plus, il y a une diminution des cellules CD25⁺ dans les TN indiquant que le développement T est affecté avant l'expression de CD4 et CD8 ainsi qu'avant le réarrangement du TCR β . L'acquisition de CD25 est normalement accompagnée d'une forte prolifération, comme ceci n'a pas lieu dans les souris IL7R^{-/-}, l'IL7 doit être impliqué dans ce processus. Enfin, le développement des cellules B est bloqué au stade pro-B ; par contre la présence de quelques cellules matures démontre que le développement des cellules lymphoïdes peut se faire sans la phase d'expansion régulé par l'IL7R (Peschon et al., 1994).

L'IL7 est donc une cytokine importante pour la survie et la prolifération des précurseurs B et T. En son absence, les précurseurs sont bloqués dans leur différenciation (au stade pro-B et à la transition TN1-TN2).

F) Rôle de la recombinaison dans le développement des cellules lymphoïdes

Rag1 (gène d'activation de la recombinaison1) a été isolé suite à sa capacité à induire le réarrangement V(D)J sur des fibroblastes en culture. La mutation de Rag1 (par ciblage de gènes) chez la souris entraîne une réduction dans la taille des organes lymphoïdes qui ne contiennent pas de lymphocyte T et B mature. L'arrêt de la différenciation de ces cellules a lieu à des stades précoces et corrèle avec l'incapacité de réarranger les gènes des TCR et BCR (Mombaerts et al., 1992).

Lors du développement T, deux pics d'expression de Rag1 (et Rag2) ont été observés (hybridation in situ et northern blot). En effet, une première vague d'expression est observée au stade TN CD25⁺ (correspondant à l'apparition du TCR β , γ et δ) et une seconde au stade DP (correspondant à l'expression du TCR α) (Wilson et al., 1994).

En ce qui concerne l'implication de Rag1 dans le développement B, Yu et al. ont démontré par RT-PCR que les cellules B matures n'expriment pas Rag1 (ni Rag2). Par ailleurs, les lymphocytes B immatures (dans la MO et la rate) expriment Rag1 (et Rag2). Dans ces cellules le niveau d'expression de l'ARNm diminue en corrélation avec la maturation des lymphocytes c'est-à-dire avec l'acquisition d'un niveau élevé d'immunoglobuline M (IgM) à la surface cellulaire. En effet, il y a de trois à cinq fois moins d'ARNm de Rag dans les cellules B immatures (faible niveaux d'IgM de surface) que dans les cellules pré-B, et de cinq à vingt-cinq fois lorsque ces cellules expriment des taux élevés d'IgM (Yu et al., 1999).

Ainsi Rag1 marque les précurseurs B au stade les plus précoces de la différenciation alors que dans le thymus, il apparaît au stade TN2 démontrant ainsi que dans ces derniers il n'est pas essentiel à l'engagement des progéniteurs.

G) Un gène clé dans la différenciation T : Notch1

Notch 1 est un récepteur transmembranaire qui fait partie d'une famille très conservée (du ver jusqu'à l'Homme) de régulateurs du développement. Chez les mammifères il y a 4 récepteurs Notch (Notch1-4) qui sont activés par 5 ligands (Delta-like 1, 3 et 4 et Jagged 1 et 2) (Radtke et al., 2010).

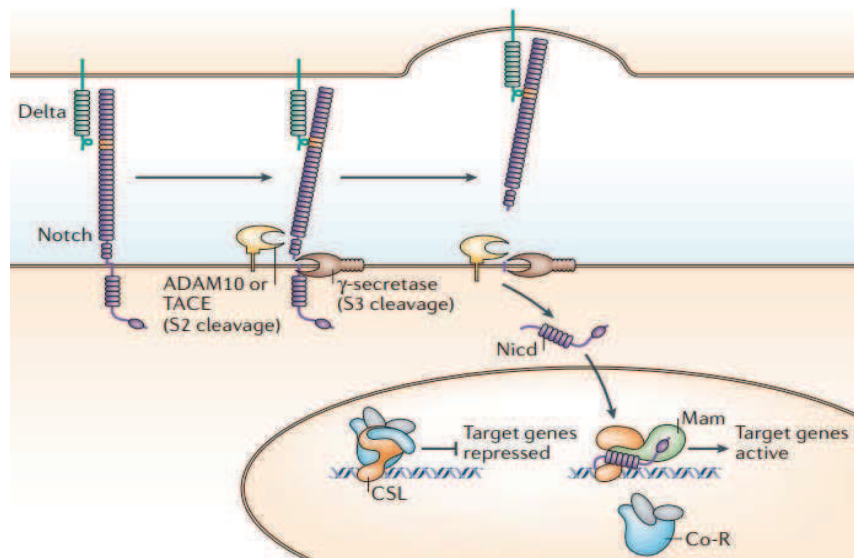


Figure 17 : La voie Notch (Bray, 2006).

La liaison du ligand delta avec le récepteur Notch entraîne 2 clivages du récepteur (par ADAM10 puis la γ -secretase). Ce processus permet le relargage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui va ainsi pouvoir migrer dans le noyau afin d'interagir avec une protéine de liaison à l'ADN (CSL) et induire la transcription de ces gènes cibles (Bray, 2006).

Comme je l'ai expliqué auparavant (chapitre I, 2), Notch1 a un rôle important dans les CSH. En effet, il inhibe la différenciation des CSH et favorise leur auto-renouvellement (Duncan et al., 2005; Stier et al., 2002).

Les progéniteurs de la MO, transduits avec un rétrovirus contenant le domaine intracellulaire de Notch1, peuvent se différencier en cellules myéloïdes mais leur développement en lymphocytes est dramatiquement altéré. En effet, 3 semaines après-greffe de ces progéniteurs, la MO des souris receveuses contient des cellules T immatures ($CD4^+CD8^+$) et un blocage précoce dans la lymphopoïèse B est observé (Pui et al., 1999).

En parallèle, des transplantations de cellules de MO de souris *Notch1*^{-/-} (système Lox-Cre inducible par l'interféron) dans des souris irradiées létalement, entraîne un blocage dans la différenciation T précoce (TN1) et un développement ectopique de cellules B dans le thymus des souris receveuses (Radtke et al., 1999).

Ces deux études démontrent ainsi que *Notch1* est un régulateur clef dans le choix d'une différenciation lymphoïde T *versus* B.

Plus récemment, un autre gène a été démontré comme ayant des fonctions inverses : LRF (proto-oncogène) impliqué dans la différenciation B. En effet la délétion conditionnelle de LRF entraîne un phénotype identique à celui de la surexpression de *Notch1* : un blocage précoce dans le développement B et une production de cellules DP dans la MO. Ainsi LRF semble être aussi un gène clef dans la détermination d'un lignage B ou T (Maeda et al., 2007).

H) Les récepteurs aux chimiokines : CCR7 et CCR9

Comme nous allons le voir ci-dessous, ces récepteurs sont impliqués dans l'entrée des progéniteurs de la MO dans le thymus d'où leur intérêt et notre choix de les étudier.

CCL21 et CCL25 sont les ligands produits par les cellules épithéliales thymiques dont les récepteurs sont CCR7 et CCR9, respectivement. Ces derniers vont permettre par chemo-attraction la migration des progéniteurs qui les expriment vers le thymus. Plusieurs équipes se sont intéressées au mutant pour l'un ou l'autre de ces récepteurs puis au double délété. Je vais donc ici vous présenter quelques études qui en utilisant des souris mutantes démontrent l'implication de ces récepteurs dans la différenciation lymphoïde T.

Dans un premier temps, l'expression de CCR7 est restreinte aux cellules entre TN1 et TN2 (CD25^{int}CD44⁺). Dans les souris déficientes en CCR7, le nombre de thymocytes présent est réduit par rapport au contrôle. De plus, la perte de CCR7 entraîne un blocage partiel de la transition TN1-TN2 induisant une accumulation de ces cellules.

CCR7 semble donc être important pour un développement T normal (Misslitz et al., 2004).

Quant à CCR9, il est fortement exprimé à la surface des DP et son expression diminue sur les cellules SP (CD4⁺). L'étude de souris CCR9 déficientes a démontré un délai d'environ un jour dans la génération des cellules DP et TCRαβ⁺ en comparaison du sauvage. Démontrant ainsi que malgré sa forte expression au stade DP, CCR9 ne semble pas avoir d'effet majeur sur le développement T. De même, dans les souris déficientes en CCR9, il y a une réduction du nombre de cellules pré-pro-B mais aucun effet sur la génération de lymphocytes B matures (Wurbel et al., 2001).

En constatant que la déficience en CCR9 ne résulte pas en une totale absence de thymocytes, il pourrait alors y avoir un mécanisme de compensation entre CCR9 et CCR7 (et inversement). L'étude de souris double KO (DKO) a mis en évidence une réduction du nombre d'ETP dans le thymus de ces souris en comparaison de sauvage ou des simples mutants (figure 17) suggérant ainsi que les 2 récepteurs ont un rôle important dans l'entrée au thymus. Les cellules Lin⁻ provenant des souris DKO sont quasi absentes du thymus de receveur lors d'expériences de transplantations. Suite à des cultures sur OP9-DL4 et des injections intra-thymiques, il a été démontré que les Lin⁻ de la MO des souris DKO n'avaient pas de problème de différenciation dans la voie T. Dans la MO et la circulation de ces souris, les CSH, MPP et CLP sont dans les mêmes proportions que chez le contrôle (avec une légère réduction du nombre de MPP circulant). Malgré la faible fréquence d'ETP présente dans le thymus des souris DKO (7 fois moins que dans le sauvage) il n'y a qu'une réduction légère du nombre de DN3 (environ moitié moins comparé au contrôle) et enfin un nombre normal de thymocytes plus tardif est retrouvé (figure 17) (Krueger et al., 2010).

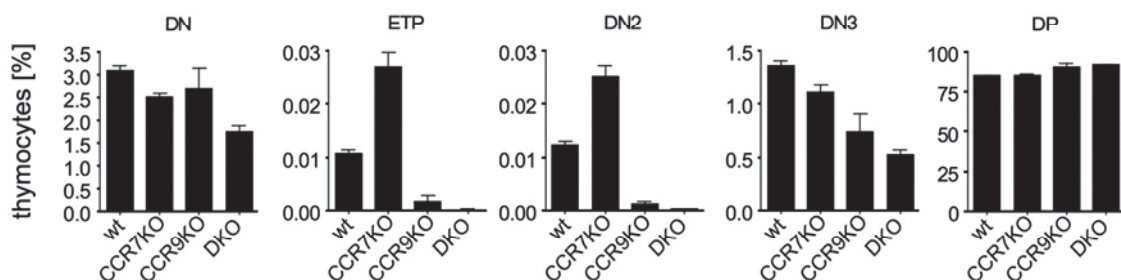


Figure 18 : Analyse des thymus de souris sauvages CCR7^{-/-}, CCR9^{-/-}, et DKO (adapté de (Krueger et al., 2010)).

L'analyse par cytométrie en flux des thymus de souris sauvage, simple KO et DKO a permis de quantifier la proportion des différentes populations de thymocytes : DN (subdivisés en ETP, DN2 et DN3) et DP.

L'étude de la prolifération (BrdU, Ki-67 et DAPI) des différentes populations thymiques a mis en évidence que les DN3 (population non proliférative dans les souris sauvages) étaient dans les DKO fortement proliférative. Ce mécanisme de compensation du faible nombre d'ETP permet de retrouver une cellularité normale (Krueger et al., 2010).

Ces données permettent ainsi de démontrer l'importance de CCR7 et CCR9 dans le développement des lymphocytes T et prouvent également un effet de compensation (et donc une redondance) entre ces 2 récepteurs aux chimiokines qui expliquent ainsi le phénotype léger des souris ayant été mutées pour l'un ou l'autre de ces récepteurs.

Problématiques et Objectifs

I. Contexte du projet de recherche

La complexité de l'hématopoïèse a pu être mise en évidence suite à l'observation de différentes anomalies trouvées dans le système hématopoïétique chez l'Homme. Ceci donne lieu à de nombreuses études qui permettent de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules de la lignée hématopoïétique (des progéniteurs de la MO aux cellules matures). Les connaissances ainsi gagnées permettent de compenser les différentes déficiences observées dans le système hématopoïétique.

Les étapes permettant la différenciation des différentes lignées hématopoïétiques sont relativement bien décrites. En effet, les progéniteurs donnant naissance aux cellules myéloïdes et B ont été identifiés et les mécanismes de maturation permettant *in fine* l'obtention des cellules matures fonctionnelles le sont aussi.

Cependant, la voie de différenciation vers la lignée T reste encore assez mal connue, ceci étant certainement dû au fait que sa maturation est beaucoup plus complexe. Il reste ainsi quelques questions en suspend concernant le processus d'engagement de la CSH vers une différenciation dans la lignée T.

- L'identité du progéniteur provenant de la MO colonisant le thymus reste controversé. En effet, plusieurs progéniteurs sont candidats, notamment les MPP et CLP, qui selon l'équipe de A. Krueger auraient autant l'un que l'autre la capacité de coloniser le thymus et d'y générer des cellules T matures (Saran et al., 2010).
- Plusieurs populations de précurseurs semblent ainsi capables de coloniser le thymus. En effet, il a récemment été démontré l'existence en périphérie (MO, sang, intestin et rate, voir chapitre III) de plusieurs précurseurs restreints à la lignée T avant leur entrée dans le thymus : ces précurseurs sont tous capables de donner des lymphocytes T fonctionnels suite à la colonisation de ce dernier.
- De même, l'existence de ces différents précurseurs T posent la question du site de l'engagement. En effet, certains de ces précurseurs peuvent être générés en

absence de thymus. Il serait alors intéressant de savoir où les progéniteurs peuvent acquérir leurs signaux de différenciation dans la voie du lignage T. Plusieurs signaux sont aujourd'hui connus : CCR7, CCR9 et PSGL1 qui vont permettre aux progéniteurs de migrer vers le thymus. Ces derniers peuvent être acquis suite à leur sortie de la MO dans la circulation sanguine ou dans la MO et seulement ceux ayant reçu les signaux peuvent circuler afin de coloniser les différents organes donnant les précurseurs T extra-thymiques ou intra-thymiques. Cependant, les signaux en amont, dans la MO, sont encore à préciser.

- Ceci entraîne alors la mise en place de différents mécanismes permettant l'engagement T chez les progéniteurs qui restent à être déterminer. En effet, les molécules et / ou les signaux (chimiokines) qui permettent aux cellules d'initier un devenir T doivent être précisé. Il est vrai cependant que quelques facteurs de transcription dit « clés » pour engendrer un engagement dans la voie de différenciation lymphoïde T sont connus :
 - ✓ Le récepteur transmembranaire Notch1 (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999).
 - ✓ Le facteur à doigt de zinc Gata3 (Hosoya et al., 2009; Laïosa et al., 2006; Ting et al., 1996).

II. Problématique

Le but de l'étude présentée ici est d'essayer de répondre à une des questions qui reste en suspend sur la différenciation T : quels signaux permettent un engagement vers la lignée T à partir de la CSH ?

En effet, les signaux entraînant un engagement vers le lignage T et que le ou les lieux dans lequel ils sont initiés sont mal identifiés : dans la MO, dans la circulation sanguine, dans le thymus ? L'existence de précurseurs T extra-thymiques indique qu'au moins deux types de signaux sont nécessaires : ceux qui génèrent ces précurseurs et ceux qui achèvent leur développement.

Afin d'apporter une réponse à ces questions, l'équipe dans laquelle j'ai effectué mes travaux étudie depuis plusieurs années les précurseurs engagés dans la lignée T présents dans la rate. Ces derniers ont été identifiés dans les SC12 (colonies spléniques 12 jours post-transplantation de cellules de MO dans des souris irradiées). Cette population ne nécessite pas de thymus pour être générée (Lancrin et al., 2002) mais en a besoin pour générer des lymphocytes T matures (ou de l'épithélium intestinal) (Arcangeli et al., 2005). Les derniers travaux issus de notre laboratoire ont démontré que la population de cellules Lin-Thy1.2⁺ est beaucoup plus abondante dans des souris athymiques que chez des souris sauvages démontrant ainsi qu'ils sont retenus dans la rate en absence de thymus (Gautreau et al., 2007). De plus, lors de greffe de MO, ces précurseurs sont générés avant les ETP dans le thymus (2 *versus* 3 semaines post-injection respectivement) (Résultats de l'équipe non publiés et (Maillard et al., 2006).

La problématique de mon travail a alors été de savoir quelle population de progéniteurs de la MO peut coloniser la rate pour générer ces précurseurs T Lin⁻Thy1.2⁺. Comme nous travaillons dans un modèle de souris athymiques, cela permettra de savoir quel progéniteur de la MO a un potentiel intrinsèque dans l'engagement T.

En effet, comme nous avons pu le voir précédemment (chapitre I.C.3), il existe une grande controverse sur le progéniteur de la MO qui génère le lignage T. Pour certains, il s'agit du CLP (Karsunky et al., 2008; Kondo et al., 1997; Serwold et al., 2009) et pour d'autres, c'est un progéniteur en amont de ce dernier (Allman et al., 2003; Schwarz and Bhandoola, 2004; Wada et al., 2008).

Pour réaliser ce travail, j'ai étudié l'expression génique des différentes sous-populations progénitrices de la MO et de la circulation sanguine afin de voir si certaines avaient déjà une expression de gènes permettant l'engagement vers la voie T ou pas.

III. Objectifs et approches expérimentales

Suite aux différents travaux effectués, mon projet de thèse était donc de déterminer la population de progéniteur de la MO pouvait générer les précurseurs T présents dans la rate. L'identification de cette population avait pour objectif de déterminer quel progéniteur de la MO avait déjà un potentiel engagement T et permettre ainsi de faciliter l'identification du progéniteur colonisant le thymus. Afin de l'identifier, les progéniteurs de la MO ont été subdivisés en population (LSK, MPP et CLP) puis en sous-populations (MPP1, 2 et 3 et CLP Flt3⁺ et Flt3⁻). Ces différents types cellulaires ont été par la suite greffés dans des souris nudes. Le choix de ce modèle est intéressant car il permet d'éliminer toute influence thymique. Ainsi, le progéniteur de la MO contenant un potentiel T intrinsèque a pu être mis en évidence.

En parallèle et afin de confirmer les données obtenues *in vivo*, il était aussi intéressant de suivre le profil d'expression de plusieurs gènes impliqués dans les différents devenir hématopoïétiques au cours de la différenciation des MPP et CLP. En effet, l'engagement vers la voie de différenciation T nécessite la mise en place d'un programme génétique de différenciation : les gènes spécifiques à la lignée T sont activés alors que ceux permettant l'engagement vers d'autres voies (myéloïdes et B) doivent être inhibés. Tout ceci est donc un système complexe qui permettra la mise en place d'un engagement vers la voie T. Toutes les cellules même si elles appartiennent à une seule et même population ne sont pas au même stade d'engagement les unes par rapport aux autres. Ainsi pour comprendre et mettre en évidence les mécanismes mis en jeu lors de la différenciation, il était nécessaire de développer une technique permettant de quantifier l'expression de plusieurs gènes dans une cellule unique. Pour cela, au sein de notre laboratoire une technique de RT-PCR multiplexe a été mise au point permettant d'étudier l'expression de plusieurs gènes (jusqu'à 20) au sein d'une cellule (Peixoto et al., 2004). Grâce à cette technique, il nous a alors été possible d'observer l'expression de gènes spécifiques à la voie T (Notch1 et Gata3) ainsi que ceux non-spécifiques (tel que Gata2 pour les CSH) dans chaque progéniteur de la MO (Gautreau et al., 2010). Suite à ces travaux, mon projet de thèse a ainsi été d'étudier

l'expression de différents gènes à l'échelle unicellulaire de chaque progéniteur de la MO: MPP1, 2 et 3 et CLP Flt3⁺ et Flt3⁻. L'utilisation de cette technique m'a alors permis d'établir un profil génétique des différentes populations d'intérêt mais aussi de mettre en lumière de potentielles relations entre chacune.

L'ensemble de ces données m'a permis de revisiter l'arbre hématopoïétique et de proposer un nouveau schéma.

Résultats

**Extrathymic pre-T cells are generated by multipotent progenitors rather than
common lymphoid progenitors**

Short title: Multipotent progenitors contain all T potential.

Vanessa Zeponi, Carolina Martinez-Cingolani, Amine Boudil, Valérie Pasqualetto, Lamia Skhiri, Laetitia Gautreau Rolland, Agnès Legrand, Jerome Megret, Flora Zavala¹ and Sophie Ezine

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1020, and Université Paris Descartes, Unité Mixte de Recherche, Paris, France

¹ CNRS/Université UMR 8147, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France

Correspondence to:

Sophie Ezine, Inserm U1020, CHU Necker, 156 Rue de Vaugirard, F-75015 Paris, France.

Phone: +33 140 615 365; Fax: +33 140 615 580

E-mail: sophie.ezine@inserm.fr

Character count, not including abstract, materials and methods, figure legends, references and acknowledgements: 3215 words, 7 figures and 39 references.

Abbreviations: TF: transcription factor; BM: bone marrow; PCR: polymerase chain reaction; CCR: chemokine receptor; IL7R α : interleukin-7 receptor alpha.

Abstract

Extrathymic pre-T cells can be detected in many tissues and represent an immediately competent population for rapid T cell reconstitution in the event of immunodeficiency. In order to determine which bone marrow (BM) subset is involved in the generation of these populations, we studied the respective contributions of two candidate populations: multipotent progenitors (MPPs) and common lymphoid progenitors (CLPs). We evaluated the populations' respective abilities to generate splenic pre-T cells (Lin⁻Thy1.2⁺CD25⁺Il7Ra⁺) after grafting recipient nude mice. We found that MPP stage3 (MPP3) cells were the most effective subset (relative to CLPs). A minor fraction of the MPP3 subset had a lymphoid-biased profile, as characterized by expression of Rag1, Notch1 and Il7Ra genes. Although these genes are also expressed in CLPs, the latter only give rise to B cells in the spleen. Even though CLP Flt3⁻ are poorly represented in the BM, they are abundant in the blood and about 20% express Notch1. In contrast, MPP3 cells are the only circulating MPP subset and the fact that 50% express Notch1 may account for their efficiency. Thus, extrathymic pre-T cells are generated by the MPP3 subset, which (through maintenance of Notch1 expression in the blood) contains the full intrinsic T cell potential.

Introduction

Lineage commitment is still an important question in hematopoiesis. Within the bone marrow (BM), commitment towards a given lineage proceeds through the loss of ability to generate other lineages (**Fig. 1**)¹. Several differentiation stages have been identified, in relation to the cells' developmental potential. Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) hematopoietic stem cells (HSCs, subdivided into long-term (LT) and short-term (ST) HSCs) gradually lose their self-renewal potential; LT-HSCs can fully reconstitute hematopoiesis throughout the organism's life span, whereas ST-HSCs are only capable of reconstitution for the first two months of life. Short-term HSCs give rise to multipotent progenitors (MPPs)^{2,3}, which can be subdivided according to their VCAM-1 and Flt3 expression¹. Each subset has a distinct lineage potential. The first VCAM-1⁺ Flt3⁻ subset (MPP1) can generate all blood cell lineages. The following VCAM-1⁺ Flt3⁺ subset (MPP2) has lost megakaryocyte/erythroid potential. Lastly, the VCAM-1⁻ Flt3⁺ subset (MPP3) has lost myeloid potential^{1,4} and gives rise to the common lymphoid progenitor (CLP, the source of B cells)⁵.

These subsets' respective contributions to the T cell pathway are still being hotly debated. Indeed, it is not known whether (i) MPP-like early hematopoietic progenitors or a specific, restricted, CLP-like subset contribute to thymopoiesis, (ii) T commitment also occurs in the BM or only within the thymus and (iii) priming precedes migration to the thymus. Most studies have been performed *in vitro*⁶ or *in vivo* in irradiated recipient mice⁷. These data revealed that CLPs rapidly adopt a double-negative (DN) 2 phenotype upon thymus entry⁸. It has also been claimed that the CLP generates most of the cells that seed the thymus⁹; after plus/minus sorting (so that all BM fractions were compared on the basis of their actual abundance), CLPs (but not MPPs) were found to produce a rapid wave of thymocytes. Other researchers have suggested that MPPs or a VCAM-1⁻ Flt3⁺ subset thereof (referred to as lymphoid-primed multipotent progenitors, LMPPs) migrate to the thymus^{10,11} because the cell surface phenotype is similar to that of early thymic progenitors (ETPs). It is known that (i) MPPs and DN1 cells have greater proliferative potential than CLPs and (ii) DN1 cells can emerge in the absence of CLPs¹⁰.

In order to identify the BM subset with T cell potential and avoid any influence of the thymus, we evaluated the ability of MPPs and CLPs to generate extrathymic pre-T cells in athymic recipients.

Most pre-T cells are generated within the thymus during the transition from triple-negative stage 2 (TN2) to triple-negative stage 3 (TN3). After a series of further differentiation steps,

these "in situ" progenitors generate mature T cells. Meanwhile, progenitors with restricted T lineage potential have been described in the gut ^{12,13}, the BM ¹⁴ and the spleen ¹⁵⁻¹⁷. However, the latter's contribution to mainstream thymopoiesis is unclear. These cells would have to seed the thymus before giving rise to mature T cells. In fact, Lin⁻Thy1.2⁺CD25⁺Il7R α ⁺ pre-T cells are naturally present in the murine spleen ^{16,17} and are also found in the spleen after BM transplantation ^{15,16}. The cells arise before the generation of ETPs (our unpublished data and ¹⁸) and accumulate in the spleen after thymectomy ¹⁷.

Here, we report on the ability of MPPs and CLPs to give rise to extrathymic Lin⁻Thy1.2⁺CD25⁺ pre-T cells before day 15 post-graft in the spleen of athymic recipients. We found that the MPP3 subset is the only circulating MPP subset and is more effective than the CLP population in generating pre-T cells. Single-cell expression profile analysis of chemokine receptor genes and other genes specifically involved in progenitor differentiation provided us with novel information on the intrinsic T cell potential among BM progenitors.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 (B6) Ly5.1, B6 Ly5.2 and B6 (nu/nu) mice were used at six to 8 week-old (both males and females). B6 Ly5.2 mice were purchased from Centre d'Elevage R. Janvier (Le Genest St Isles, France). B6 (nu/nu) mice and B6 Ly5.1 were purchased from CDTA (Orléans, France) and were kept in specific pathogen-free conditions.

Antibodies

The following monoclonal antibodies (mAbs) were used for staining and cell sorting and were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA) and eBiosciences (San Diego, CA) : anti-CD3 (145-2C11), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD8 β (H35-172), anti-CD11a (LFA1, 2D7), anti-CD11b/Mac-1 (M1/70), anti-CD19 (1D3), anti-CD25 (IL-2R α , PC61), anti-CD29 (HM β 1-1), anti-CD44 (H-CAM, 1M781), anti-CD45.1/Ly5.1 (A20-1.7), anti-CD45.2/Ly5.2 (104-2.1), anti-CD49b (DX5), anti-CD90.2/Thy1.2 (53-2-1), anti-CD106 (VCAM-1, 429), anti-CD117/c-kit (SCF-Receptor, 2B8), anti-CD122 (interleukine-2R- β), anti-CD127/IL7R α (A7R34), anti-CD135 (Flt3/Flk2, A2F 10.1), anti-CD184 (CXCR4, 2B11), anti-CD197 (CCR7, 4B12), anti-CD199 (CCR9, 242503), anti-NK1.1 (PK136), anti-Sca-1 (stem cell antigen-1, E13-161.7), anti-Ly-6G/Gr1 (RB6-8C5), anti-TCR β (H57-597), anti-TCR δ (GL3), anti-NKp46 (29A1.4), anti-Ly76 (Ter119), anti-IgM (11/41). They were directly coupled to FITC, APC, APCCy7, APCeF780, PE, PeCy7, or PerCPCy5.5, or conjugated with biotin. The latter being revealed by streptavidin-APC, streptavidin-PECy7 or streptavidin-PE-Texas Red (BD Pharmingen, San Diego, USA).

Cell sorting and grafting

Bone marrow cells from C57BL/6 mice were first incubated with unconjugated rat antibodies against Ter119, Gr1, CD8 α , CD4 and B220 (which are specific for erythroid cells, myeloid cells, mature T cells and mature B cells, respectively). Positive cells were magnetically depleted with sheep anti-rat IgG-conjugated beads and sheep anti-mouse IgG-conjugated beads (Dynabeads M-450; Dynal Biotech, A.S., Oslo, Norway). The remaining cells (Lineage-negative cells, Lin⁻, enriched) were labeled with Abs against c-Kit, Sca-1 and lineage (Lin) Ags (NK1.1, TCR β , TCR δ , CD8 β , CD19, Ly-6G and Ly76). Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ cells are called LSK. Anti-CD106 and anti-CD135 Abs were additionally used to isolate the different subsets of MPP: MPP1 (LSK Flt3⁻ VCAM-1), MPP2 (LSK Flt3⁺ VCAM-1⁺) and MPP3 (LSK Flt3⁺ VCAM-1⁻). CLP populations is characterized by the addition of anti-Il7R α

and their phenotype is Lin⁻ Sca1^{lo} c-Kit^{lo} Il7R α ⁺ and can be divided thanks to CD135 expression in CLP Flt3⁺ or Flt3⁻.

Cell sorting was performed on a FACS Aria I upgraded with DIVA software (BD Biosciences, San Diego, USA). Sorted populations were grafted intravenously into sub-lethally irradiated (850rad) B6 (nu/nu) recipient. Those mice were sacrificed at different time points and spleen and BM analysed.

RT-PCR

Cell sorting was performed on a FACS Aria I upgraded with DIVA software and equipped with an automatic cell deposition unit (ACDU, BD Biosciences, San Diego, USA). Single cells were collected in individual PCR tubes containing 5 μ L Nuclease-free water (Promega) and processed for multiplex RT-PCR, as described previously^{19,20}. They were lysed by freezing at -80°C, followed by heating to 65°C for 2 min. After cooling at 4°C, RNA was specifically reverse transcribed for 1h at 37°C and then incubated for 3 min at 95°C for inactivation of reverse transcriptase. Next, cDNA generated by the reverse transcription reaction were amplified by a semi-nested PCR. The first round of PCR consisted of a denaturation step at 95°C for 10 min, 15 amplification cycles (45 s at 95°C, 60 s at 60°C, and 90 s at 72°C) and a final step at 72°C for 10 min. This simultaneous amplification of all cDNAs was followed by a second round of specific PCRs: the first-round PCR products were separated and amplified with specific primers. The second round of PCR consisted of a denaturation step at 95°C for 10 min and then 54 amplification cycles (30 s at 95°C, 45 s at 70°C, and 60 s at 72°C, with the hybridization temperature decreased from 70-60°C every other cycle). The types and amounts of reagents used for reverse transcription and PCR amplifications were described²⁰. PCR products were detected on a 1.5% agarose ethidium bromide gel.

Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed by adding 12 μ l of 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) to each well containing 4 μ l of first PCR products and 8 μ l of a primer mix with 0.25 μ M of each specific primer in a 24- μ l reaction volume, using the ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). After a denaturation step at 95°C for 10 min, 60 amplification cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 45 s at 72°C) were performed. Slope values were determined for the exponential PCR phase by using the Sequence Detection System software (version 2.2; Applied Biosystems). The PCR efficiency

was assessed for the linear phase of the reaction using LinRegPCR software (version 7.0). Statistical tests of the technique's validity (a t-test and an ANOVA) were performed using GraphPad Prism for Windows Software (version 4; GraphPad, San Diego, CA).

Genes	Primer sequences
<i>CCR7</i>	A: CAAAAGCACAGCCTTCCTGT
	B: GGCTCTCCTTGTCATTTTCC
	C: TGTACGTCAGTATCACCAGC
<i>CCR9</i>	A: ACCATGATGCCCACAGAACT
	B: ATGCCACACAGAACTCACAAG
	C: ACAAGGATGACCAGGCTGTT
<i>E2A</i>	A: AGCGATCTCCATGGGCTTTT
	B: GTCGGCTACTGATGCGATTT
	C: GGCCAGTCTTTTGCATAACC
<i>Gata2</i>	A: CAGAAAGTGCTGAACCCTGA
	B: GGTGGAATTCCAGTGGTTCT
	C: ATTGGAAAGCAGTGTCGGGA
<i>Gata3</i>	A: TCGGCCATTCGTACATGGAA
	B: TGGATGGACGTCTTGGAGAA
	C: ATCGATGGTCAAGGCAACCA
<i>Il7Rα</i>	A: CCCTCTGACCTGAAAGTCGT
	B: GGTAGAACTTGGACTCCACT
	C: GTAAAGCATGATGTGGCCTAC
<i>Notch1</i>	A: GCTACGAATGTGCCTGTGAA
	B: CATACGTAGCCACTGGTCAT
	C: CAACGAGTGCAACAGTAACC
<i>Pu1</i>	A: CCAACGTCCAATGCATGACT
	B: GCATGTAGGAAACCTGGTGA
	C: AGAACTTCCCTGAGAACCACT
<i>Rag1</i>	A: CAACCAAGCTGCAGACATTC
	B: CTACTGGAGACTGTTCTAGG
	C: GCAGACATTCTAGCACTCTG

Results

1 - Extrathymic pre-T cells are mainly generated by MPPs.

Pre-T cells can be considered as the first step towards commitment to the T cell pathway. In order to identify the source of the extrathymic pre-T cells found in the spleen of B6 and nude mice ¹⁷, various BM subsets were sorted (**Fig. 1**) and grafted into congenic athymic nude mice. Between 7000 and 20000 donor cells sorted from the lineage negative (Lin⁻ : NK1.1⁻, TCRβ⁻, TCRδ⁻, CD8β⁻, CD19⁻, Ly-6G⁻ and Ly76⁻) subset, the Sca1⁺ c-Kit⁺Flt3⁻ (LSK Flt3⁻) subset and MPP and CLP populations from C57Bl6 Ly5.1 mice were grafted intravenously (**Fig. 1B**). We then screened for the cell progeny in the spleen of nude (Ly5.2) recipients between 8 and 30 days post-transplant (**Fig. 2**).

Significant numbers of donor-type cells were identified in the spleen of LSK- and MPP-grafted nude recipients (**Fig. 2A**). Very few donor cells were generated from CLP recipients, regardless of the number of grafted cells, the injection route and the day of analysis (**Fig. 2A**). The MPPs' progeny were able to rapidly and effectively generate Lin⁻Thy1.2⁺CD25⁺ pre-T cells in the spleen. Evaluation of the number of pre-T cells collected before and after day 15 revealed that MPPs were more active at early time points (**Fig. 2B**). These data revealed that MPPs were more able than CLPs to generate extrathymic pre-T cell.

Analysis of Flt3 display enabled us to identify two distinct subsets of CLPs ⁷. It has been claimed that CLP Flt3⁻ give rise to B cells, whereas CLP Flt3⁺ cells have both B and T potential ⁷. Therefore, grafting of each subset and analysis of the host mice between 10-30 days later showed that the CLP Flt3⁻ subset was better able to give rise to a few splenic pre-T cells (about 400-800 cells, detected at day 30 only) than the major CLP Flt3⁺ subset was (**Fig.3A**). Overall, the chimerism observed with CLP grafting was more abundant in the spleen than in the BM, where donor cells generated mainly IgM⁺ B cells (**Supplemental Fig. 1**).

2 - The MPP3 subset gives rise to extrathymic pre-T cells.

The various MPP subsets were sorted as in **Fig. 1B** and between 1x10³ and 4x10³ cells were grafted into congenic, athymic nude mice. **Fig. 3B** shows the numbers of splenic pre-T cells generated respectively by MPP1, MPP2 and MPP3 subsets on days 10, 15, 22 and 29 post-injection, with 3 to 5 mice per day and per group.

Pre-T cell generation peaked at day 15 with all three subsets. The MPP3 subset was the most competent in terms of the production of splenic pre-T cells. Our data show that 1.642×10^6 , 0.434×10^6 and 0.144×10^6 cells were recovered from the spleens of MPP3-, MPP2- and MPP1-recipient hosts, respectively. The amounts detected at later time points did not differ as greatly. In contrast, the counts at days 10 and 15 emphasize each subset's intrinsic capacity; hence, MPP3 cells colonize the spleen more rapidly and give rise to pre-T cells more effectively.

We found that $\text{Mac1}^+\text{Gr1}^+$ cells were present in the BM and spleen of MPP1 and MPP2 recipients but only in the spleen of CLP recipients (**Supplemental Fig.1**)

3 - The MPP3 subset is the main circulating MPP subset

We wondered whether the MPP3 subset's ability to generate extrathymic pre-T cells could have been due to their rapid migration to the spleen and rapid differentiation into more restricted populations.

By screening the blood for the presence of MPPs, we found that the MPP3 subset was more abundant than the MPP1 and MPP2 subsets were (**Fig. 4**). The few cells detected in the blood were all $\text{VCAM-1}^-\text{Flt3}^+$, indicating their ability to access the spleen.

Blood screening also revealed the presence of the CLP Flt3^- subset, which was poorly represented in the BM. Hence, in contrast to the situation in the BM compartment, the MPP3 and CLP Flt3^- subsets were the most common circulating progenitors with access to the spleen.

4 - CCR9 expression in MPP3 cells as an indicator of T commitment

In both fetal and adult T cell development, the chemokine receptors CCR7 and CCR9 have been implicated in thymic colonization and homing of progenitors. Thus, we next looked at whether the differences between circulating MPP and CLP subsets were related to expression of the genes for the chemokine receptors *CCR7* and *CCR9*²¹⁻²³ (**Fig. 5**) by performing single-cell RT-PCR analyses according to a previously described method^{19,20}. This technology was particularly appropriate because of the low cell numbers involved. Hence, single-cell analysis of *CCR7* and *CCR9* expression in the BM was performed on between 23-71 cells. Both receptors were first detected in the MPP2 subset (4% of positive cells, **Fig. 5A**). The frequency of *CCR* gene expression was greater in the MPP3 subset (11% of positive cells,

Fig. 5A). A co-expression analysis revealed that *CCR7* and *CCR9* genes were expressed by independent populations within the MPP3 subset in the BM.

In contrast, 18% of circulating MPP3 cells expressed *CCR7* only, 55% (40 out of 72) expressed *CCR9* only, and 15% were double expressors (**Fig. 5A**). Thus, within the predominant MPP3 subset, the frequency of *CCR9*⁺ expression was higher in circulating cells than in BM cells.

Of the various CLP subsets, in the BM, 30% of the CLP Flt3⁺ cells expressed *CCR7* only, 35% expressed *CCR9* only and 12% expressed both receptors (**Fig. 5B**). In contrast, the minor (CLP Flt3⁻) BM subset had a greater proportion of *CCR9*⁺ cells (40%) than *CCR7* but no double-positive cells. In the blood, most CLPs belong to the Flt3⁻ subset (fewer than 10% expressed *CCR7* or *CCR9*). In contrast, 54% of the CLP Flt3⁺ circulating cells expressed *CCR7* or *CCR9*. Thus, CCR expression analysis revealed that MPP subsets are heterogeneous and provided a novel means of differentiating between circulating and BM cell populations.

5- Molecular analysis of lineage specific genes in the MPP3 subset

In order to analyze the lineage commitment status of the MPP3 subset, we evaluated the expression of several key genes involved in stem cell, myeloid and T cell lineage commitment (**Fig. 6**).

As expected, the *Gata2* gene (involved in homeostasis and proliferation of stem cells²⁴ was significantly less expressed in BM MPP3 cells than in MPP1 and MPP2 cells. Only 16% of single MPP3 cells were *Gata2*⁺ (**Fig. 6A**), versus 57% of MPP1 cells and 46% of MPP2 cells. In contrast, the *PU1* myeloid gene²⁵ was expressed at much the same frequency (70%-95%) in all MPPs subsets.

Lymphoid commitment is best characterized by *E2A*, *Il7Rα* and *Rag1* expression²⁶⁻²⁸. As depicted in **Fig. 6B**, all MPP subsets were positive for expression of the *E2A* gene involved in B-T commitment. About 40% of MPP1 cells and MPP2 cells were *E2A*⁺ although the frequency was markedly higher in the MPP3 subset (68%). In contrast, *Il7Rα* and *Rag1* were only expressed in a small proportion of MPP3 cells: 18% (8 out of 44 single cells analyzed) were *Il7Rα*⁺ and 18% (20 out of 111 single cells analyzed) were *Rag1*⁺.

Analysis of the *Gata3* and *Notch1* expression frequencies yielded contrasting results²⁹⁻³¹; the expression frequency for *Gata3* decreased during the MPP1 to MPP2/3 transition, whereas that of *Notch1* increased significantly (**Fig. 6C**). Within the MPP3 subset, 9% of the cells were *Gata3*⁺ and 67% were *Notch1*⁺.

Interestingly, further changes in lymphoid gene expression occurred in the blood. In circulating MPP3 cells, the expression frequency for E2A was just 29% (down from 68% in the BM) and Rag1 expression was not detected. In contrast, Pu1 and Il7R were expressed to similar extents by circulating MPP3 cells and those in the BM.

Similar analyses of CLP subsets confirmed the latter's lymphoid commitment, with no Gata2 expression and infrequent Pu1 expression¹⁹. Furthermore, Rag1 was widely expressed (73% of the cells were Rag1⁺; data not shown) and E2A was found to be stable in all CLP subsets (**Fig. 7**). Gata3 expression was detected in CLP Flt3⁻ of the BM and maintained in the blood. Interestingly, Notch1 was expressed less frequently in CLP Flt3⁻ cells than in Flt3⁺ subset. Overall, circulating CLPs conserved the low Notch1 expression frequency detected in the BM (**Fig. 7**). Our results highlight the commitment events in the BM versus the blood.

Discussion

Our study results showed that MPP3s represent the BM compartment with intrinsic T cell potential and are able to generate extrathymic pre-T cells in the spleen of nude mice. Although CLP populations express also CCR9, are found in the blood and colonize the spleen to generate B cells, they are devoid of T cell activity in the absence of a thymus.

By evaluating the source of extrathymic pre-T cells in the nude spleen, we were able to gain insights into the MPP and CLP populations' T cell specificities. As evidenced by their hierarchy in the hematopoietic tree, the MPPs always produced the downstream populations. Each of the MPP1, MPP2 and MPP3 subsets may have been more effective in producing T cells than the CLPs were. Indeed, in our experimental setting, the fact that only the MPP3 subset generated extrathymic pre-T cells raises doubts as to the CLP's ability to do so. The existence of T-cell potential in CLPs has been challenged in many studies^{10,32,33}. Despite their use of unsorted MPPs, Richie Ehrlich et al showed that pre-T cells are generated by both MPPs and CLPs in the thymus of irradiated hosts at early time points³⁴. However, CLPs generate pre-T cells more effectively in lethally irradiated hosts; their progeny is detected a week earlier and is more abundant than under sublethal conditions. Hence, the generation of pre-T cells by CLPs is sensitive to the conditioning regimen. In our setting (sublethally irradiated nude hosts), CLPs generated large numbers of B cells more quickly than the MPP3 subset did. However, the CLPs were not able to initiate T cell commitment. Taken as a whole, our results show that the T cell potential is concentrated within the MPP3 subset and does not rely on the CLP stage. Our results also suggest that an inhibitory mechanism might prevent CLPs from activating the T cell pathway.

When considering the various MPP subsets, the MPP3 population does not have common myeloid progenitor potential but might conserve some degree of granulocyte-macrophage (GM) potential. It has been reported that (i) a VCAM-1⁺RAG1⁺ MPP population is immediately upstream of the CLP population and (ii) the MPP3 population is the unique source of CLPs³⁵. Indeed, we detected Rag1 and Il7R expression (using single-cell RT-PCR assays) in about 10% of MPP3 cells; this shows that a minor subset of the MPP3 population is able to generate CLPs in the BM.

T cell commitment is best characterized by Gata3 and Notch1 expression. The trace *GATA3* expression detected in our experiments may be a carry-over from LT-HSCs³¹, since full expression is only detected in the thymus³⁶ (and our unpublished data). Notch1 expression dictates the T vs. B lineage decision^{29,30,37}. Our single-cell RT-PCR analysis revealed that Notch1 expression was significantly more frequent in MPP2 and MPP3 cells than in MPP1

cells and that expression is conserved in circulating progenitors. Interestingly, we showed that *CCR9* expression represents a novel marker for T commitment. Indeed, *CCR9* expression was also activated in the BM, MPP2 and MPP3 cells and circulating progenitors. This finding suggests that only *CCR9*⁺ MPP3 were mobilized in the blood and/or that *CCR9*⁻BM progenitors up-regulated this receptor once in the circulation. Furthermore, circulating CLP Flt3⁻ had a lower *CCR9* frequency than CLPs in the BM; this might be related to the absence of T cell activity and low *Notch1* expression in the blood. Taken as a whole, our data highlight the role of *CCR9* and *Notch1* expression by BM progenitors as the initial sign of commitment to the T cell pathway.

Most of literature studies have evaluated the role of the LMPP subset^{3,38}, which encompasses the Flt3-expressing MPP2 and MPP3 subsets. As shown here and by others^{1,4}, single-cell analysis showed that these subsets are heterogeneous. As the main circulating population, the MPP3 population has a weak self-renewal capacity (as evidenced by a low frequency of *Gata2* expression) and is partially committed to the lymphoid pathway (as demonstrated by high *E2A*, *Il7R*, *Notch1* and *Rag1* expression). This novel subset merits further characterization.

Although a number of literature studies have detected MPPs in the blood, they failed to characterize these progenitors³⁹. Our study provides valuable information on the circulating MPP3 subset. After initiation of the lymphoid commitment in the BM, circulating populations were found to have differentiated further (as evidenced by down-regulation of *E2A* expression and loss of *Rag1* expression). This suggests that (i) the priming initiated in the BM continues in the blood and (ii) these progenitors do not represent non-specific leakage of BM cells into the circulation. Therefore, passage into the bloodstream may be a crucial step towards the final lineage decision.

In contrast with many previous studies, we were able to detect CLPs in the subset of circulating Flt3⁻ cells. This discrepancy may be due to fact that these literature studies were screening for the largest (CLP Flt3⁺) BM subset³⁹. Our study raises the question of the CLP's role in T lymphopoiesis in general and the generation of extrathymic T cell precursors in particular. By choosing athymic mice for our graft experiments, we removed the thymic influence on BM precursor cells. We found that in this context, CLPs were unable to give rise to splenic pre-T cells. In line with other reports¹⁰, our data also show that CLPs (regardless of their Flt3 expression status⁷) are B-committed and thus gives rise to mature (IgM⁺) B cells. We hypothesized that the CLPs require another signal from the BM or/and the circulation (i.e. in addition to *CCR9* and *Notch1* expression). The CLPs' inability to generate extrathymic pre-

T cells in this setting may be explained by lack of commitment in the absence of thymic influence. It has been reported that CLP Flt3⁺CD27⁺ cells are the major source of T cell ⁹. However, we did not detect this subset in the blood, since the main circulating CLP subset had lost Flt3 expression. Our study results cannot be extrapolated to consideration of the role of CLPs in thymopoiesis. However, less than 20% of the circulating CLP Flt3⁺ cells expressed Notch1 (compared with 50% of the MPP3 cells). Hence, MPP3 cells are prime candidates for thymic colonization. In conclusion, our study results show that the MPP3 population represents the reservoir of T-cell-progenitor in the BM, owing to the maintenance of Notch1 expression.

Acknowledgments

The authors thank C. Cordier from the Institut Fédératif de Recherche 94 (IFR94) for technical assistance with single-cell sorting and F. Vasseur. Unit 1020 receives core funding from the INSERM. VZ received a Dim Stem-Pole fellowship; A.B. was funded by La Ligue Contre le Cancer and the Société Française d'Hématologie (SFH); LS received a postdoctoral fellowship from la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); LG received a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and the Association de la Recherche sur le Cancer (ARC). This project was also funded by grants to S.E. from ARC, FRM, l'Association Française contre les Myopathies (AFM) and l'Agence de la BioMédecine.

Authorship Contributions

V.Z. performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; C.M. performed the initial experiments; A.B., V.P. and L.G.R. provided the tools for Multiplex; L.S. and A.L. assisted with performing the single cell qRT-PCR experiments; J.M. performed all cell sortings; F.Z. assisted with analyzing the data and suggestions for the manuscript; S.E. supervised the research project, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Lai AY, Kondo M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 2006;203(8):1867-1873.
2. Boyer SW, Schroeder AV, Smith-Berdan S, Forsberg EC. All hematopoietic cells develop from hematopoietic stem cells through Flk2/Flt3-positive progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):64-73.
3. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14541-14546.
4. Lai AY, Lin SM, Kondo M. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol*. 2005;175(8):5016-5023.
5. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91(5):661-672.
6. Lai AY, Kondo M. Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6311-6316.
7. Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*. 2008;111(12):5562-5570.
8. Krueger A, Garbe AI, von Boehmer H. Phenotypic plasticity of T cell progenitors upon exposure to Notch ligands. *J Exp Med*. 2006;203(8):1977-1984.
9. Serwold T, Ehrlich LI, Weissman IL. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood*. 2009;113(4):807-815.
10. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*. 2003;4(2):168-174.
11. Zlotoff DA, Bhandoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1217:122-138.
12. Saito H, Kanamori Y, Takemori T, et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science*. 1998;280(5361):275-278.
13. Lambolez F, Azogui O, Joret AM, et al. Characterization of T cell differentiation in the murine gut. *J Exp Med*. 2002;195(4):437-449.
14. Garcia-Ojeda ME, Dejbakhsh-Jones S, Chatterjea-Matthes D, et al. Stepwise development of committed progenitors in the bone marrow that generate functional T cells in the absence of the thymus. *J Immunol*. 2005;175(7):4363-4373.
15. Lancrin C, Schneider E, Lambolez F, et al. Major T cell progenitor activity in bone marrow-derived spleen colonies. *J Exp Med*. 2002;195(7):919-929.
16. Arcangeli ML, Lancrin C, Lambolez F, et al. Extrathymic hemopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. *J Immunol*. 2005;174(4):1980-1988.
17. Gautreau L, Arcangeli ML, Pasqualetto V, et al. Identification of an IL-7-dependent pre-T committed population in the spleen. *J Immunol*. 2007;179(5):2925-2935.
18. Maillard I, Schwarz BA, Sambandam A, et al. Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood*. 2006;107(9):3511-3519.
19. Gautreau L, Boudil A, Pasqualetto V, et al. Gene coexpression analysis in single cells indicates lymphomyeloid copriming in short-term hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *J Immunol*. 2010;184(9):4907-4917.
20. Peixoto A, Monteiro M, Rocha B, Veiga-Fernandes H. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res*. 2004;14(10A):1938-1947.

21. Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Forster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood*. 2010;115(10):1906-1912.
22. Wurbel MA, Malissen B, Campbell JJ. Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development. *Eur J Immunol*. 2006;36(1):73-81.
23. Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol*. 2007;178(4):2008-2017.
24. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997;89(10):3636-3643.
25. Lloberas J, Soler C, Celada A. The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today*. 1999;20(4):184-189.
26. Dias S, Mansson R, Gurbuxani S, Sigvardsson M, Kee BL. E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity*. 2008;29(2):217-227.
27. Carvalho TL, Mota-Santos T, Cumano A, Demengeot J, Vieira P. Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med*. 2001;194(8):1141-1150.
28. Wilson A, Held W, MacDonald HR. Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J Exp Med*. 1994;179(4):1355-1360.
29. Pui JC, Allman D, Xu L, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 1999;11(3):299-308.
30. Radtke F, Wilson A, Stark G, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999;10(5):547-558.
31. Ku CJ, Hosoya T, Maillard I, Engel JD. GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood*. 2012;119(10):2242-2251.
32. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 2008;452(7188):764-767.
33. Wada H, Masuda K, Satoh R, et al. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*. 2008;452(7188):768-772.
34. Richie Ehrlich LI, Serwold T, Weissman IL. In vitro assays misrepresent in vivo lineage potentials of murine lymphoid progenitors. *Blood*. 2011;117(9):2618-2624.
35. Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity*. 2002;17(2):117-130.
36. Yui MA, Feng N, Rothenberg EV. Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J Immunol*. 2010;185(1):284-293.
37. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999;93(8):2431-2448.
38. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, et al. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001;15(4):659-669.
39. Schwarz BA, Bhandoola A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol*. 2004;5(9):953-960.

Legends to the figures

Figure 1: BM subsets identification. (A) Schematic representation of cell surface phenotype of BM subsets studied; (B) Sorting of BM subsets. BM cells enriched for progenitors by magnetic beads depletion were labeled for lineage (NK1.1, TCR β , TCR δ , CD8 β , CD19, Ly-6G and Ly76), c-Kit, Sca-1, VCAM-1, Flt3 and Il7R α Ags. Numbers indicate the percentages of each population. The data are representative of at least 5 independent experiments.

Figure 2: Pre-T cell potential of LSK, MPP and CLP populations. (A) Analysis of the spleen of nude recipient 2 weeks after the graft of LSK, MPP or CLP populations. Pre-T cells (Lin⁻Thy1.2⁺CD25⁺) are detected among Ly5.1 donor type cells. Numbers indicate the percentages of each population. (B) Absolute numbers of pre-T cells recovered in the spleen of the various recipient mice after graft of LSK, MPP and CLP between 6-14 days and 18-39 days. At least 3 mice were collected per point for each condition in 4 independent experiments.

Figure 3: Extra-thymic pre-T potential of MPP's subsets after graft to nude mice. (A) Spleen from recipient nude mice grafted (1 to $4 \cdot 10^3$ cells) with CLP Flt3⁺ or CLP Flt3⁻ was analyzed at different time for the presence of donor derived pre-T cells (Lin⁻Ly5.1⁺Thy1.2⁺CD25⁺). (B) Spleen from recipient nude mice grafted (1 to $4 \cdot 10^3$ cells) with MPP1, MPP2 or MPP3 was analyzed at different time for the presence of donor derived pre-T cells (Lin⁻Ly5.1⁺Thy1.2⁺CD25⁺). The data are representative of at least 5 independent experiments with 3-4 mice/day/population.

Figure 4: Sorting of circulating subsets *versus* BM subsets. Cells were labeled for lineage (NK1.1, TCR β , TCR δ , CD8 β , CD19, Ly-6G and Ly76), c-Kit, Sca-1, VCAM-1, Flt3 and Il7R α Ags. Numbers indicate the percentages of each population. The data are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 5: Expression of chemokine receptors in sub-populations of MPP and CLP in BM and blood. (A) Expression of CCR7 (grey bars) and CCR9 (black bars) in MPP1 (23 single cells analyzed), MPP2 (24 single cells analyzed) and MPP3 (71 single cells analyzed) sub-populations in the BM and in circulation; (B) Expression of CCR7 (grey bars) and CCR9 (black bars) in CLP-Flt3⁺ (40 single cells analyzed) and CLP-Flt3⁻ (40 single cells analyzed)

sub-populations, total CLP (54 single cells analyzed) of the BM and of circulating CLP (60 Flt3⁻ single cells and 11 Flt3⁺ single cells analyzed); below histogram represent circulating CLP according to their Flt3 expression.

Figure 6: Gene expression in single cells within MPP1, MPP2, MPP3 sub-populations of the BM and circulating MPP3. (A) Gata2 and Pu1 expression. Number of single cells studied in each subset: 40, 43, 50 and 31 single cells, respectively. (B) E2A, Il7R and Rag1 expression. For E2A and Il7R, 40, 43, 44 and 67 single cells were studied in each subset; for Rag1, 107, 104, 112 and 62 single cells were studied in each subset. (C) Gata3 and Notch1 expression. For both genes 107, 112, 111 and 58 single cells were studied in each subset.

Figure 7: Gene expression analysis in single cells within CLP Flt3⁺, CLP Flt3⁻ and total CLP sub-populations of the BM and circulating CLP. E2A, Gata3 and Notch1 expression. The number of cells studied in each subset for Gata3 and Notch1 is: 45, 68, 32 and 44 respectively; for E2A 55, 43, 32 and 48 single cells were studied respectively.

Supplemental Figure 1: In vivo B and myeloid potential of CLP *versus* MPP's subsets. Spleen from recipient nude mice i.v. grafted with MPP1, MPP2, MPP3 or CLP were analyzed 2 weeks after grafting to detect donor derived B cells (Ly5.1⁺CD19⁺IgM⁺) or donor derived myeloid cells (Ly5.1⁺Gr1⁺Mac1⁺). The data are representative of at least 3 independent experiments.

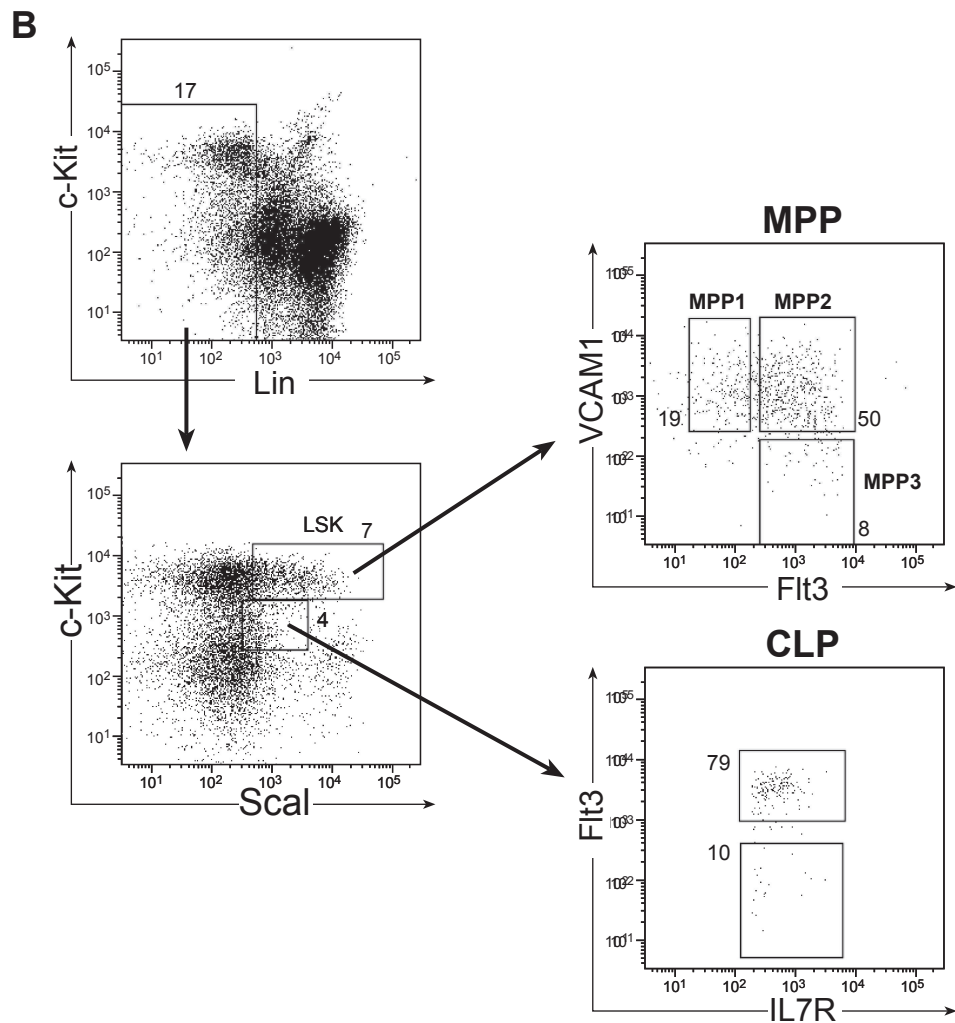
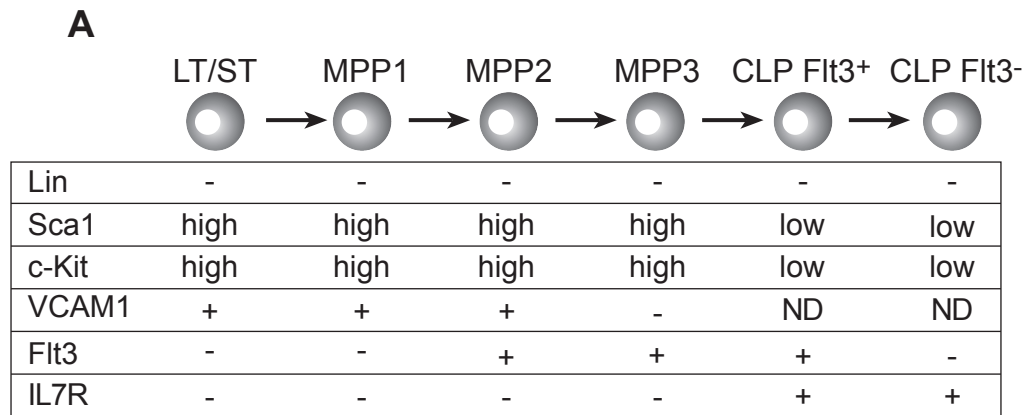


Figure 1

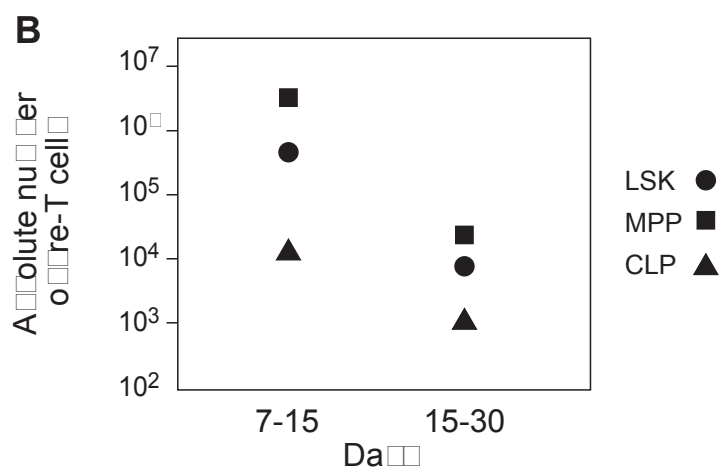
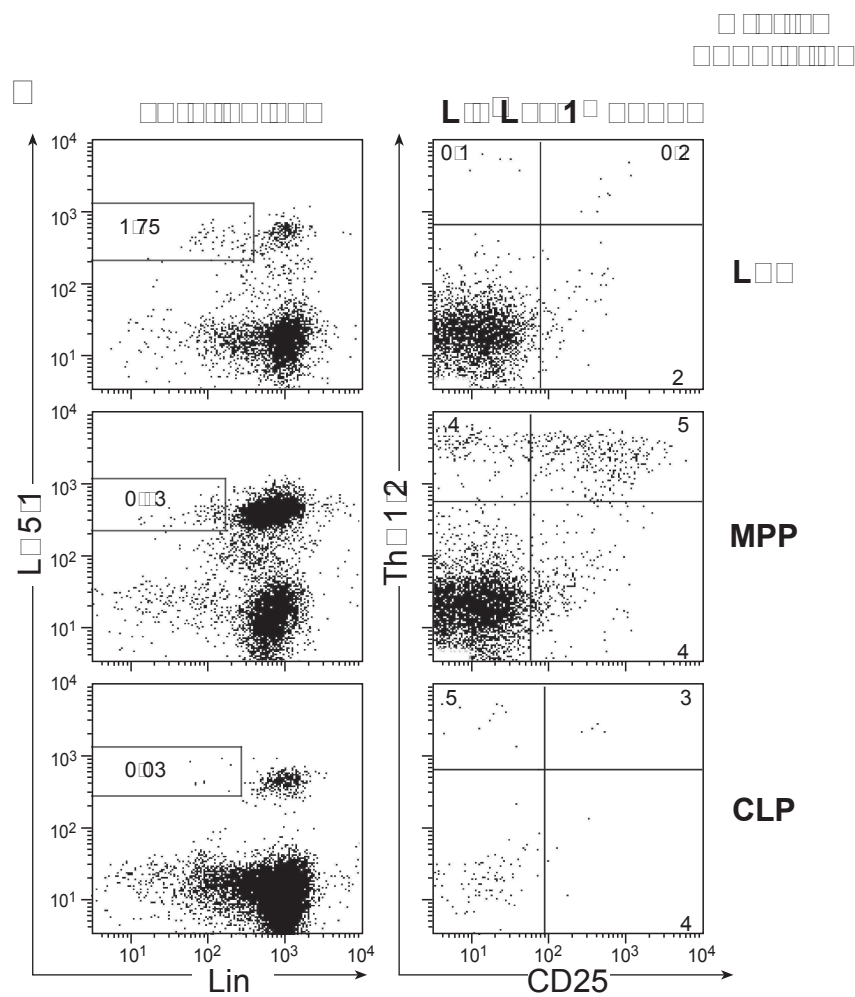


Figure 2

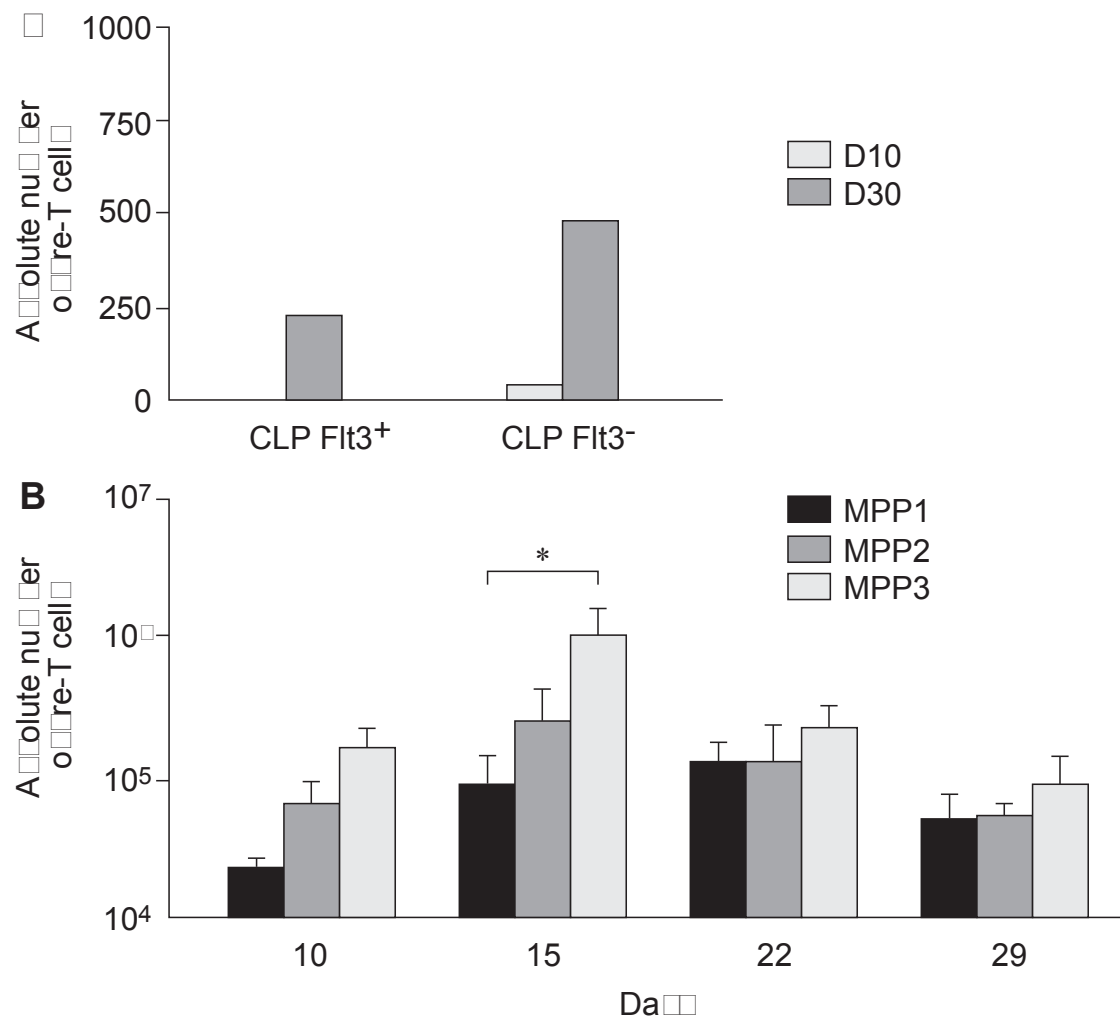


Figure 3

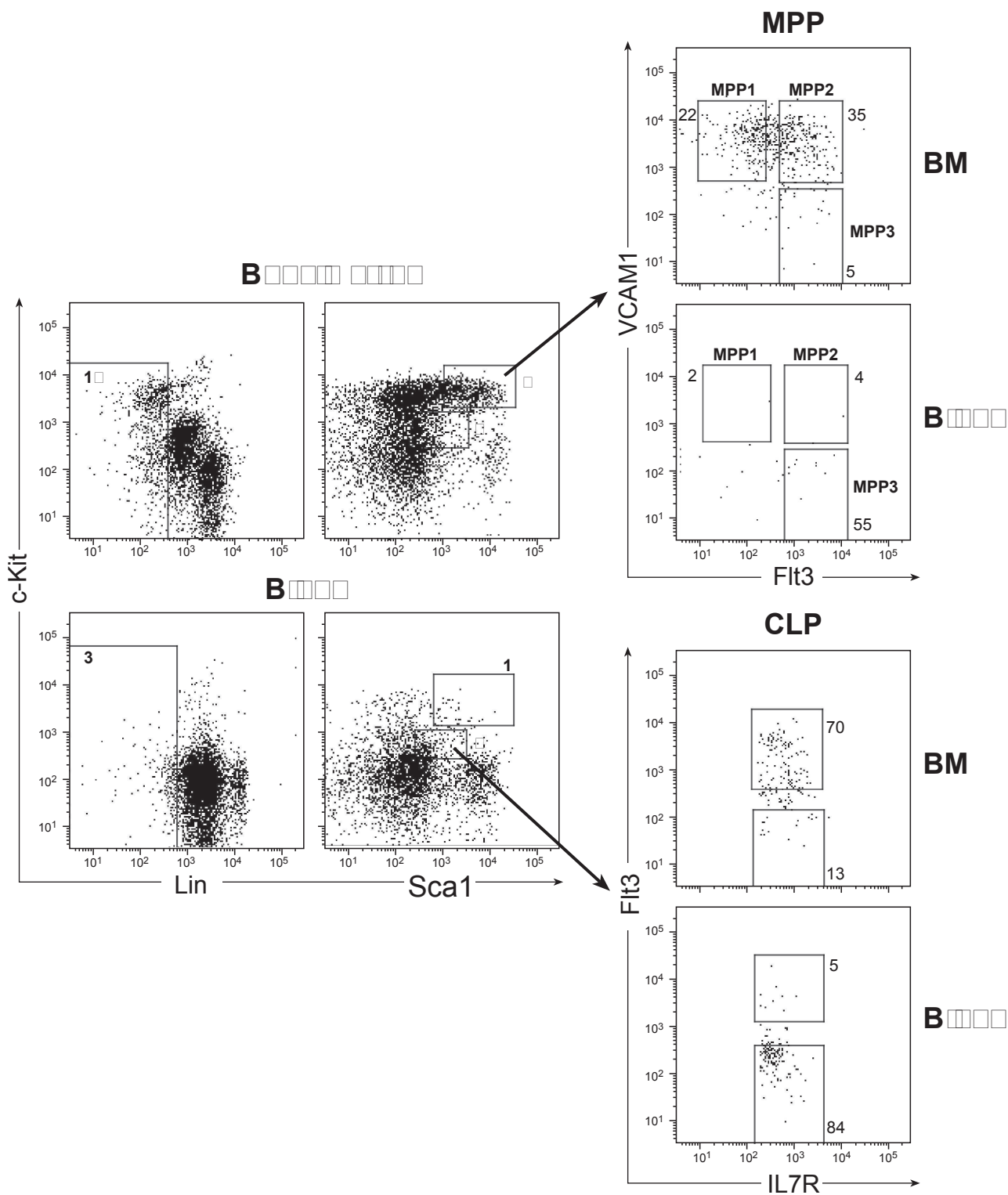


Figure 4

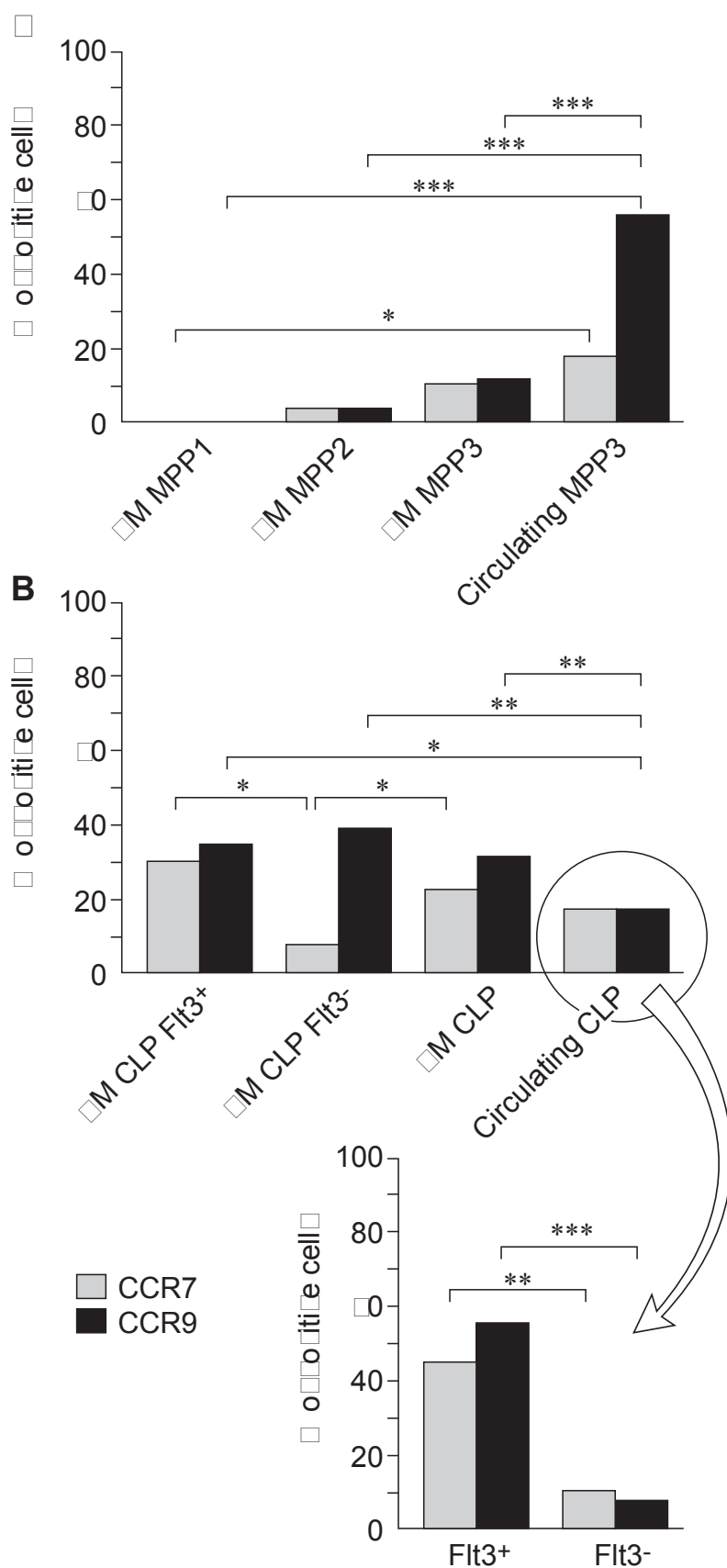


Figure 5

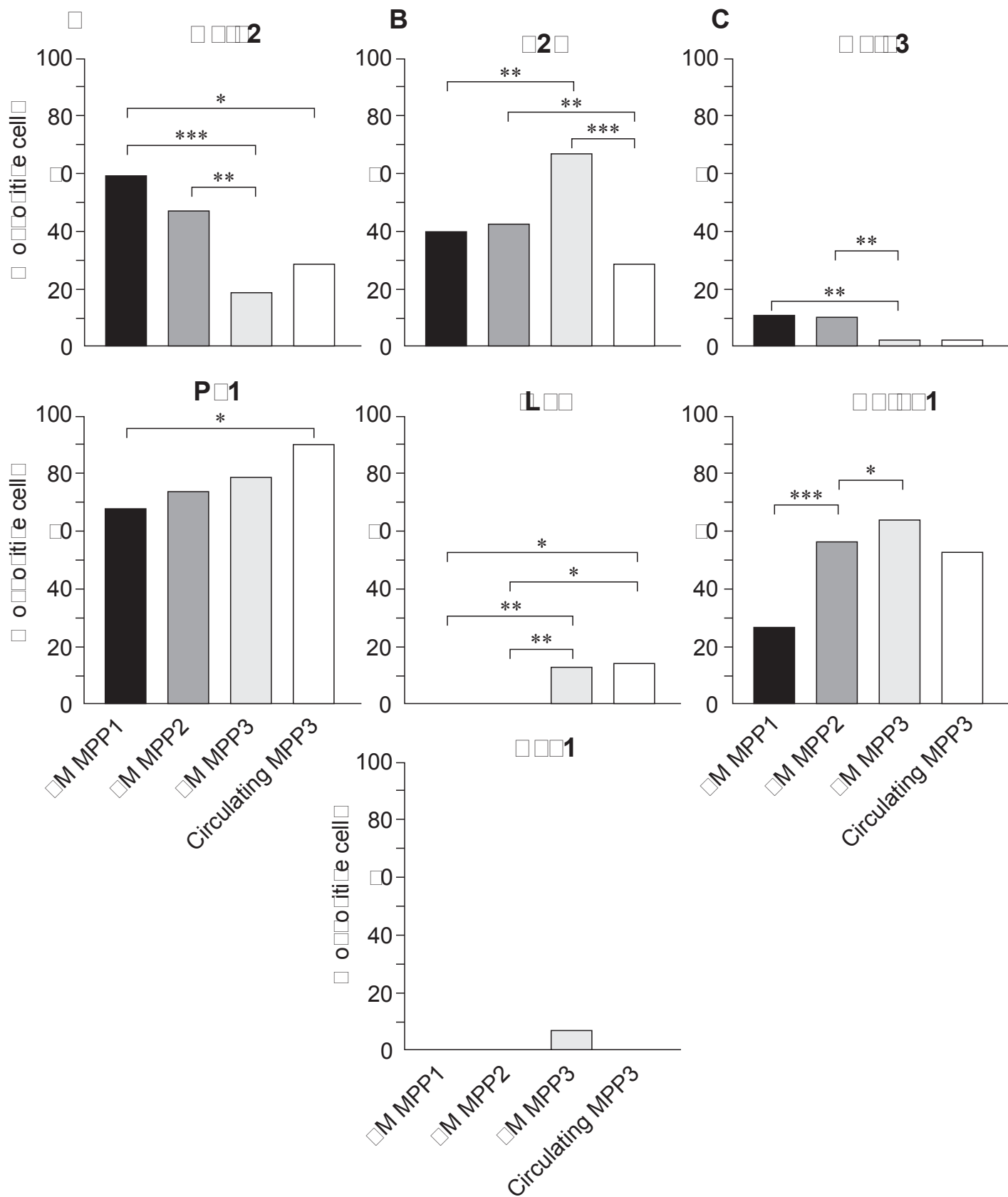


Figure 1

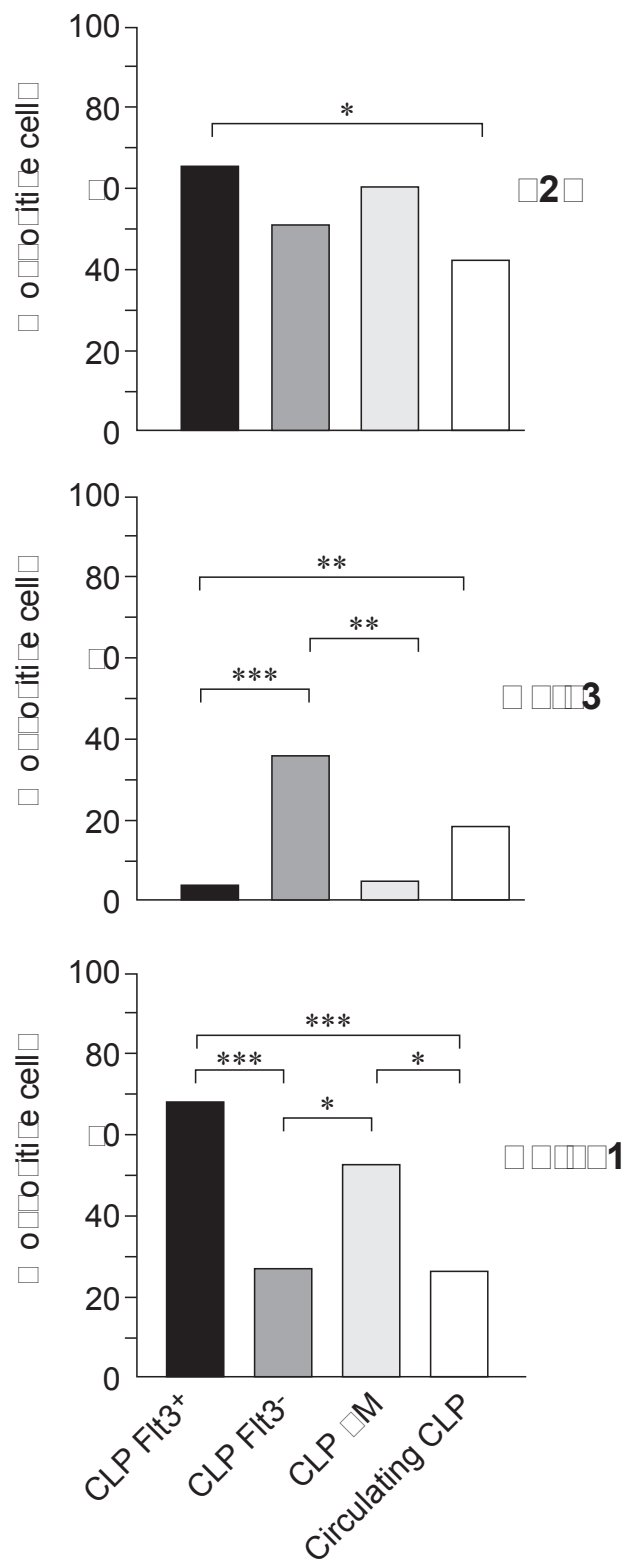
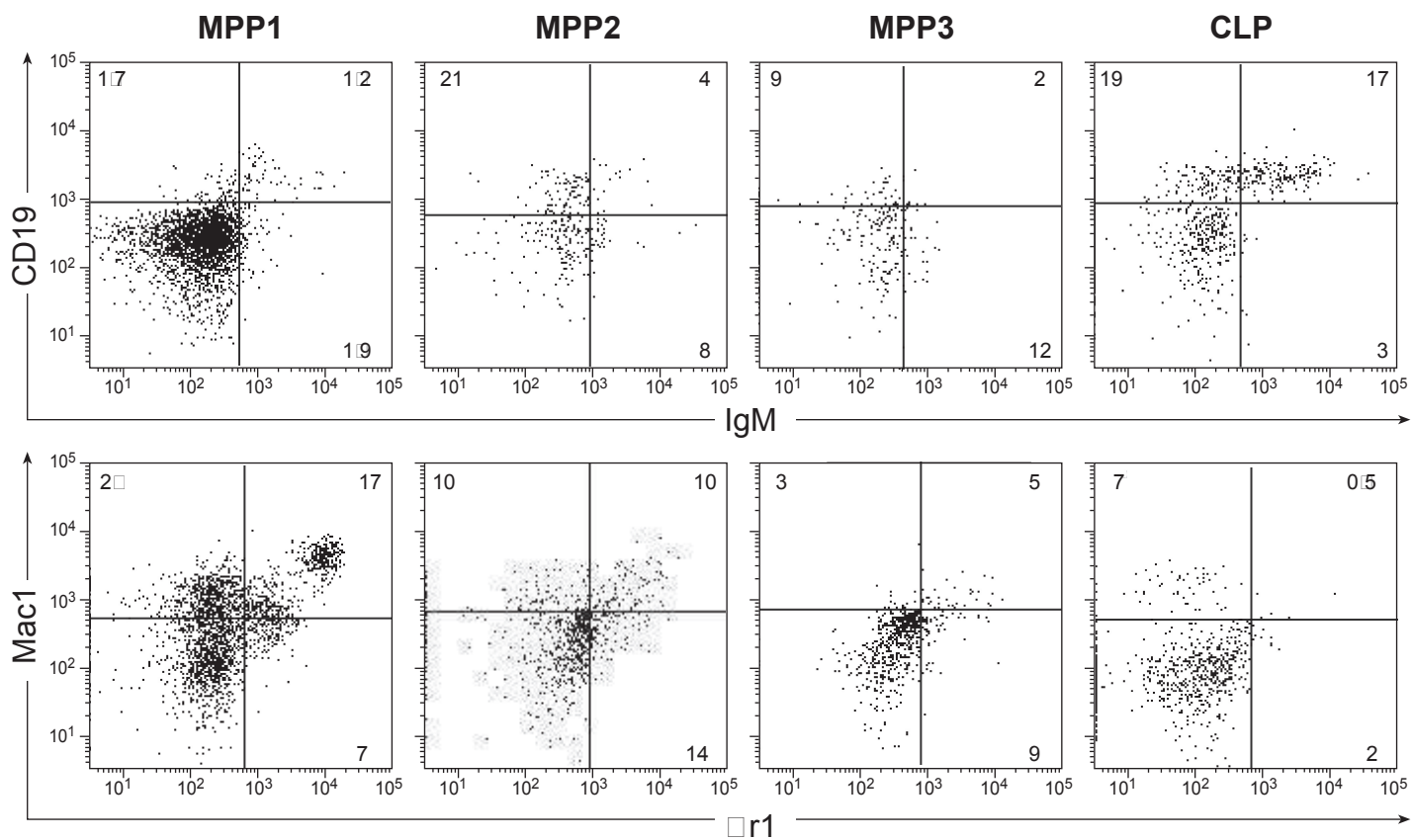


Figure 7



Su Fig 1

Discussion

I. Importance de la distinction entre MPP2 et MPP3 :

2 sous-populations distinctes

C'est entre 2001 et 2005 que les MPP sont identifiés et caractérisés sous la nomenclature de LMPP comprenant les sous-populations MPP2 et MPP3. Or, ces deux populations ont des potentialités distinctes (Adolfsson et al., 2001; Adolfsson et al., 2005; Lai and Kondo, 2006; Lai et al., 2005).

Les MPP3 donnent très peu de cellules myéloïdes et semblent aussi générer moins de lymphocytes B (CD19⁺) que les MPP2. Par contre, ils sont plus compétents dans la génération des précurseurs T extra-thymiques.

Au niveau moléculaire, la perte de l'auto-renouvellement des MPP3 (moins de 20% des cellules expriment Gata2) et l'augmentation de l'expression d'E2A (environ 70%) et de l'IL7R (15%) démontrent un engagement lymphoïde de ces progéniteurs comparativement aux MPP2. Enfin, une augmentation de l'expression de CCR9 (plus de 15% de cellules positives) démontre qu'une partie de ces cellules peuvent circuler.

Les MPP3 sont majoritairement présents dans le sang alors que les MPP2 en sont virtuellement absents démontrant ainsi leur incapacité de migrer.

Ces données démontrent qu'une sous-population de MPP3 est plus engagée vers une voie de différenciation lymphoïde que les MPP2. Ces deux groupes, ayant comme dit au dessus des potentialités différentes, doivent donc être traités séparément et non pas regroupés dans la population LMPP. De plus, la sous-population MPP3 engagée et définie par les marqueurs moléculaires doit être identifiée au niveau cellulaire pour pouvoir être étudiée plus amplement.

II. Le CLP n'a pas de potentialité intrinsèque T en absence de thymus

Le potentiel B des CLP n'est pas remis en question et la controverse se situe sur sa capacité à migrer vers le thymus (et générer des lymphocytes T) (cf. chapitre I.C.3.).

Nos expériences de greffe prouvent que le CLP a une plus grande capacité à générer des lymphocytes B ($CD19^+IgM^+$) que les différents sous-groupes de MPP. La génération de précurseurs T extra-thymique (dans des souris athymiques) par les CLP ($Flt3^+$ ou $Flt3^-$) donne de rares cellules comparativement aux MPP3 qui sont la source majeure de ces précurseurs. Ceci permet alors de conclure que sans un « signal » provenant du thymus le CLP n'est pas compétent pour donner des précurseurs T. En effet, la question d'un problème de migration de ces cellules dans la rate ne se pose pas étant donné que ce dernier y donne de nombreuses cellules B.

Ces résultats ne permettent pas de répondre à la question de la génération de lymphocytes T mature dans un contexte de souris sauvage où un thymus est présent. Mais ils permettent de démontrer que sans thymus le CLP donne uniquement des lymphocytes B même dans un cas de lymphopénie où tous le compartiment T est à reconstituer. Ceci suggère que :

- Le CLP a un devenir B par défaut.
- La fonction T du CLP est sous le contrôle d'un signal thymique.

Ceci soulève l'hypothèse d'une inhibition de l'activité T des CLP : le potentiel T des CLP serait inhibé et seul un signal thymique pourrait initier ce mécanisme.

Nos travaux indiquent que le CLP $Flt3^-$ serait le plus compétent à coloniser le thymus car il est en circulation et génère de rares précurseurs T dans la rate (environ 400 cellules/rate). Cette sous-population serait donc potentiellement impliquée dans ce développement.

Des travaux récents montrent que la capacité des CLP Flt3⁻ à générer des cellules T serait sous le contrôle inhibiteur des protéines Id qui, *via* l'inhibition de la protéine E2A, diminue l'expression de Notch1. En effet, il y a une diminution de l'expression de Notch1 dans les CLP Flt3⁻ (cette dernière étant perdue si les CLP Flt3⁻ sont transduits avec un rétrovirus contenant E47). De plus, une diminution de la protéine E2A est observée dans les CLP Flt3⁻ ainsi qu'une augmentation de l'expression d'Id2 et d'Id3 comparativement aux CLP Flt3⁺ (Pereira de Sousa, communication personnelle). Ces données permettent d'expliquer l'incapacité des CLP Flt3⁻ à générer des cellules T.

III. Le MPP3 n'est pas la seule source des CLP

Dans le thymus les progéniteurs (dès le stade TN1) ont perdu le potentiel de générer des cellules B mais conservent leur capacité de produire des macrophages et des cellules T (ainsi que des NK et CD). Ainsi, le potentiel de différenciation B est perdu avant celui de génération de cellules myéloïdes (macrophages). Le progéniteur à l'origine des cellules T aurait alors perdu le potentiel B mais conservé celui myéloïde. Ces données démontrent ainsi que le CLP (ayant perdu le potentiel de différenciation myéloïde) ne serait pas impliqué dans la différenciation de la CSH aux cellules T. Il serait alors un progéniteur du lignage B (Wada et al., 2008).

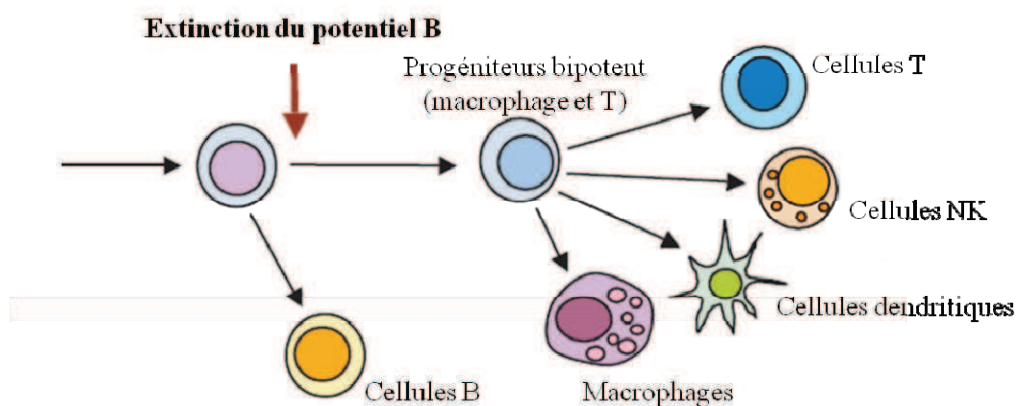


Figure 19 : Perte du potentiel B avant le myéloïde (Wada et al., 2008).

Dans les progéniteurs T précoces, le potentiel de différenciation vers la lignée B est perdu mais pas celui de générer des macrophages.

La population MPP3 génère peu de cellules $CD19^+$ (7% dont 1% de $CD19^+IgM^+$) par rapport aux CLP (34% dont 14% de $CD19^+IgM^+$) : il semblerait ainsi que le MPP3 ne soit pas la source majeure des CLP. En effet, l'étude du profil d'expression génique des MPP3 révèle qu'une sous-population minoritaire exprime l'IL7R (16%) et Rag1.

En revanche, on peut constater que les MPP2 produisent plus de lymphocytes B que les MPP3 (19% de $CD19^+$ et 5% de $CD19^+IgM^+$). Cette observation nous fait ainsi remettre l'arbre hématopoïétique actuel (figure 4) en question ; en effet, la branche des CLP doit être aussi générée à partir des MPP2 via un pré-CLP qui ne posséderait pas encore l'IL7R et Rag1.

Ces résultats confirment alors la perte du potentiel B (CLP) avant la perte de la potentialité de différenciation vers la voie myéloïde et plus particulièrement la génération des macrophages et granulocytes. Il y aurait ainsi un engagement vers la lignée B ou T qui se ferait au niveau des MPP2 sous la forme de la génération de la voie de différenciation B *via* le CLP ou la génération des lymphocytes T *via* le MPP3 (qui conserve un potentiel myéloïde).

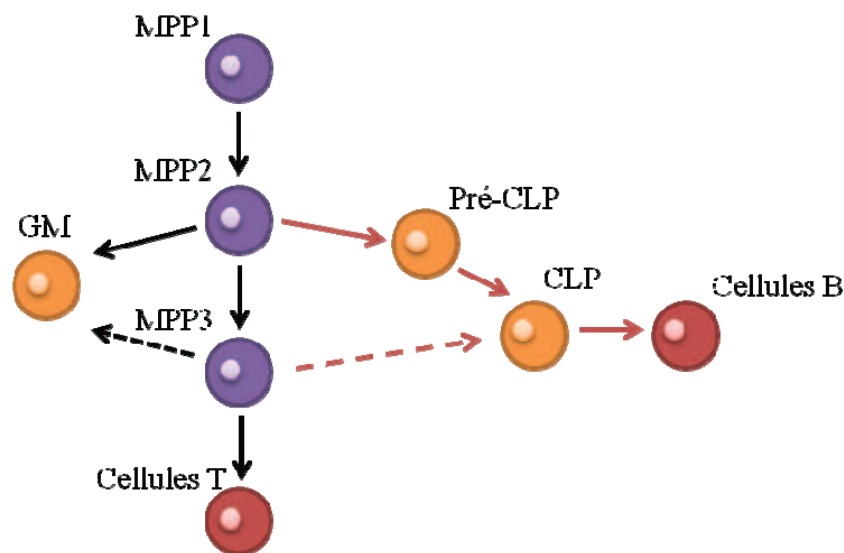


Figure 20 : L'arbre hématopoïétique modifié.

Nos hypothèses sont ici représentées en rouge. Le CLP, via un intermédiaire (pré-CLP), est ainsi majoritairement généré par les MPP2 afin de produire des lymphocytes B alors que le MPP3 serait plus engagé vers une voie de différenciation T mais une sous-population produirait tout de même des CLP. La population MPP2 serait alors le point de séparation entre le lignage B et T.

IV. Les signaux envoyés par le thymus

Les données résumées plus haut indiquent que le thymus joue un rôle crucial dans l'engagement vers la lignée T du CLP. Le thymus doit donc pouvoir « envoyer » différents signaux vers les différents organes dont la MO.

Les signaux solubles présents dans le sang peuvent provenir des cellules épithéliales thymiques (CET). En effet, la P-sélectine (molécule d'adhésion exprimée par les CET dont le ligand PSGL1 est exprimé sur les progéniteurs T) et CCL25 (ligand de CCR9) sont exprimés périodiquement par le thymus. Ces dernières permettent ainsi l'entrée ou non de progéniteurs dans le thymus. L'expression de ces molécules d'entrée par l'épithélium thymique est augmentée lorsque le thymus a besoin de précurseurs pour générer des lymphocytes T. En effet, cette expression corrèle avec la disponibilité des niches intra-thymiques (Gossens et al., 2009). En effet, ceci va permettre d'attirer des progéniteurs provenant de la MO ou de la circulation au thymus. Ainsi, il existe des signaux solubles (CCL25) et des récepteurs fixés aux CET (P-sélectine) produits par le thymus.

En plus du rôle des cytokines dans l'attraction des progéniteurs à un site donné, ces dernières sont aussi capables en culture de changer le devenir des cellules. En effet, un grand nombre de cellules Gr1⁺ sont obtenues après mise en culture de CLP avec de l'IL2 (Kondo et al., 2000). Les cytokines et leurs concentrations ainsi que le lieu où elles sont produites ont un rôle important dans l'hématopoïèse en général mais surtout dans la génération de lymphocytes T.

Cependant, les signaux donnés par les cytokines ne sont pas forcément essentiels à entraîner un engagement vers une voie de différenciation. En effet, la surexpression de Bcl2 (famille anti-apoptotique) restaure la production de lymphocytes T dans des souris IL7Rα^{-/-}. Ceci démontre que la signalisation IL7 dans le développement T et les lymphocytes T matures est nécessaire à la survie des cellules (*via* une augmentation de l'expression de Bcl2) mais ne joue pas de rôle dans l'engagement vers le lignage T (Akashi et al., 1997).

Les lymphocytes T matures peuvent aussi inhiber la génération des précurseurs T dans la rate. Ceci est rendu possible par leur consommation d'IL7 (Gautreau et al., 2007). Ces résultats permettent alors de penser que la présence de lymphocytes T peut aussi contrôler la génération de précurseurs T intra-thymiques. Cela peut donc être considéré comme un des signaux que le thymus peut donner en périphérie (vu que la production de lymphocytes T matures se fait dans le thymus).

Le rôle du thymus et des signaux qu'il « envoie » *via* la production de différentes cytokines reste à confirmer. En effet, il serait important de démontrer quels signaux présent dans la MO permettent aux progéniteurs d'en sortir et ainsi d'être attirés jusqu'au thymus. Etant donnée l'existence de vaisseaux sanguins dans la MO il est tout à fait probable de penser que les cytokines (CCL25) doivent être véhiculées grâce à la circulation sanguine selon un gradient décroissant jusqu'au site où se trouve les progéniteurs. En effet, les gradients de concentration permettent d'attirer les cellules d'un lieu où il y a peu de cytokines vers un lieu où elles sont fortement exprimées. Cependant, la production de CCL25 par les CET et l'absence de lymphocytes T matures en périphérie ne sont certainement pas les seules causes de l'attraction des progéniteurs vers le thymus.

V. Les niches de la MO soutiennent-elles un engagement vers une voie de différenciation ?

Il a été émis l'hypothèse que les CSH devaient être en contact avec des cellules de la MO leur permettant de maintenir leur état de cellules souches tout au long de la vie de l'individu (Schofield, 1978). L'équipe de M. Kondo a mis en évidence l'existence de microenvironnements spécifiques dans la MO qui favoriseraient le développement en lignages myéloïde ou lymphoïde (Lai et al., 2009) (voir chapitre I.B.2).

Plusieurs hypothèses peuvent alors être posées:

- La coexistence de deux niches distinctes dans la MO : pour un développement vers le lignage lymphoïde et l'autre vers le lignage myéloïde.
- À l'inverse, il n'y aurait qu'une seule niche myéloïde avec des signaux permettant la différenciation myéloïde et si les progéniteurs sortent de cette niche, ils perdent alors l'influence de la niche et vont alors par défaut vers le devenir lymphoïde (ou inversement s'il n'existe que des niches lymphoïdes).
- La dernière hypothèse est qu'il pourrait y avoir effectivement qu'une niche myéloïde majoritaire et lorsque les progéniteurs quittent cette niche ils entreraient dans une voie de différenciation vers la lignée lymphoïde et plus particulièrement vers la lignée B. En effet, les progéniteurs qui intrinsèquement auraient un devenir T migrerait dans le sang qui serait alors une « niche » pour ces progéniteurs.

Avant de pouvoir confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses, il faut définir quels sont les « signaux » qui peuvent être donnés aux progéniteurs par les cellules constituant les différentes niches (ou la niche) afin de les orienter vers un devenir lymphoïde ou myéloïde. L'équipe de M. Kondo a pu démontrer que les GPCR jouaient un rôle critique dans la décision du devenir lymphoïde ou myéloïde. En effet, la localisation et la différenciation des MPP VCAM1⁻ (MPP3) peut être affecté par traitement avec un inhibiteur des protéines G, ces progéniteurs donneront alors des cellules myéloïdes et plus de lymphoïdes (Lai et al., 2009).

La voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) et plus particulièrement la voie MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) a été impliquée dans la différenciation myéloïde. En effet, lorsque l'on inhibe cette voie dans des MPP VCAM1⁻, la production de cellules myéloïdes est fortement diminuée alors que celle de lymphocytes B est augmentée, démontrant alors que la voie MEK/ERK n'est pas impliquée dans la différenciation B (Hsu et al., 2007). Les auteurs en déduisent que cette augmentation est dû à un phénomène de compensation, mais on peut aussi penser que le devenir myéloïde doit être éteint pour pouvoir permettre une différenciation dans une autre voie. Ainsi, les progéniteurs qui devaient générer des

cellules myéloïdes selon leur programme génétique vont aller par défaut vers une autre lignée.

Il y a ainsi différentes voies qui semblent impliquées dans la localisation (et un devenir) : GPCR et dans le choix de la voie de différenciation des progéniteurs : la voie MEK/ERK.

Pour conclure, les MPP3 semblent avoir besoin des GPCR pour sortir d'une niche myéloïde et générer des cellules de la voie lymphoïde. De plus, il faut inhiber la voie MEK/ERK pour obtenir une différenciation lymphoïde. Ces deux études laissent alors à penser que le devenir myéloïde est prédominant sur le lymphoïde et que pour pouvoir se différencier en cellules lymphoïdes les progéniteurs doivent quitter une niche donnant des signaux myéloïdes et ainsi éteindre les voies intracellulaires entraînant cette différenciation.

De plus, il a récemment été démontré l'existence de deux niches lymphoïdes B distinctes qui soutiennent le développement de deux types de précurseurs B. Les cellules stromales de ces niches expriment soit de l'IL7 soit Gal1 (galectine1). Cette dernière est produite dans la MO et lie le pré-BCR. Ces deux niches sont distinctes et sont spécifiques des pro-B / pré-BI et des pré-BII, respectivement. Elles permettent la prolifération et la différenciation des cellules qu'elles supportent. Ainsi, les pré-BII vont migrer dans la niche Gal1 pour y terminer leur différenciation (Mourcin et al., 2011).

Il y a ainsi plusieurs signaux dans la MO activant différentes voies intracellulaires qui permettent ou inhibent un devenir cellulaire.

VI. Le rôle du sang sur les progéniteurs de la MO : **importance de l'étude des progéniteurs circulants**

Le thymus a la capacité d'exporter en plus des lymphocytes T matures, des précurseurs déjà engagés vers la voie T qui quittent le thymus avant les réarrangements du TCR (Lambolez et al., 2006). Les TN intra-thymiques co-expriment tous Gata3 et Notch1 (Boudil et al. soumis). Les progéniteurs que nous avons isolé dans la circulation sanguine ne proviennent pas de cet export thymique. En effet, grâce à notre étude du profil d'expression génique, nous avons pu démontrer que Gata3 était exprimé de façon négligeable par les MPP3 circulants (3% des cellules étudiées l'expriment). Il n'est donc pas probable que les progéniteurs en circulation proviennent de fuites thymiques, à moins que l'expression de Gata3 dans les TN soit diminuée en périphérie.

La présence dans le sang de cellules de phénotype LSK comprenant à la fois des CSH et des MPP a été démontrée par l'équipe d'A. Bhandoola (Schwarz and Bhandoola, 2004). Nos résultats démontrent aussi la présence de progéniteurs dans la circulation et plus particulièrement des MPP3, majoritairement présents. Au regard du profil d'expression génique, nous avons constaté que deux fois moins de MPP3 circulants expriment E2A, comparativement à ceux résidants dans la MO. Ce gène étant impliqué dans la différenciation lymphoïde et surtout dans la voie B (en effet, dans les précurseurs T, il potentialise l'effet de Notch1), l'entrée dans la circulation sanguine doit influencer le devenir des progéniteurs. Le sang permettant ainsi un engagement vers la voie de différenciation T.

Toutes les cellules hématopoïétiques (sauf les lymphocytes T) étant générées dans la MO, lorsqu'un progéniteur sort de l'environnement médullaire pour entrer dans le sang, les signaux donnés par les cellules stromales permettant la différenciation vers les autres lignées sont diminués. De plus, il est probable que le sang en lui-même apporte (par des cytokines) un potentiel pré-engagement vers le lignage T. Par

conséquent, la circulation sanguine est un site où, selon les concentrations en facteurs solubles et leurs rôles, l'entrée dans la voie T peut avoir lieu.

Ces différentes études démontrent que les progéniteurs de la MO possèdent un profil d'expression génique différent dans le sang. Il est donc important de prendre ces populations en compte lorsque l'on s'intéresse à l'origine des progéniteurs pouvant entrer dans le thymus pour y donner des lymphocytes T matures. En effet, nos travaux indiqueraient que le MO assure l'engagement lymphoïde et le sang l'engagement T.

VII. Les molécules de migration et d'adhésion : de nouveaux marqueurs précoces pour étudier les mécanismes de l'engagement

PSGL1 est exprimé sur toutes les cellules des différentes populations de progéniteurs de la MO. La mesure de la liaison de PSGL1 avec son ligand (la P-sélectine) a permis de démontrer que l'expression de PSGL1 fonctionnel est graduellement augmentée avec la différenciation des CSH (26%) vers les MPP (47%) et les LMPP CCR9⁺ (70%) (Sultana et al., 2012).

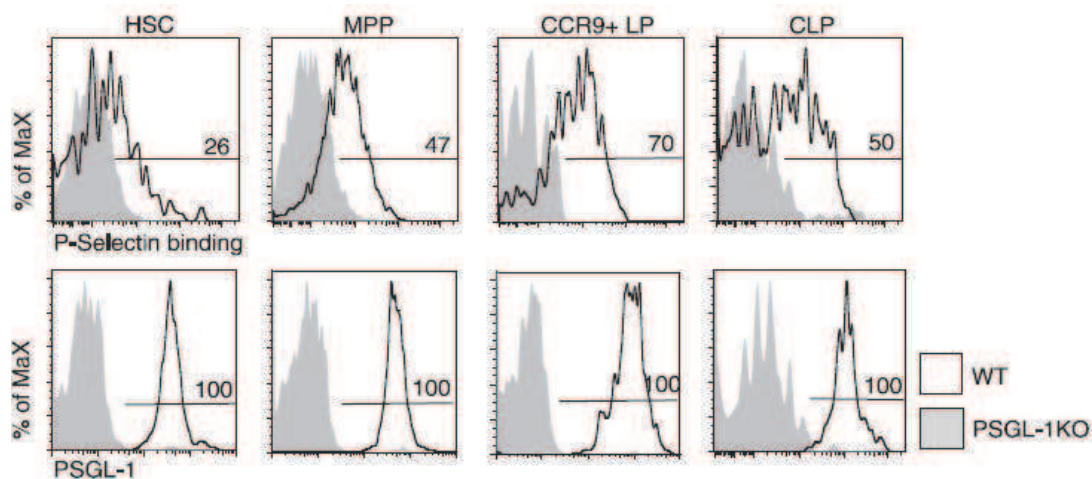


Figure 21 : L'expression de PSGL1 (Sultana et al., 2012).

Malgré le fait que PSGL1 soit exprimé par tous les progéniteurs de la MO (histogramme du bas), seulement une partie est fonctionnelle (histogramme du haut). On constate ainsi une augmentation de sa fonctionnalité au cours de la maturation des CSH.

Par ailleurs nos résultats montrent que l'expression de CCR9 est augmentée au cours de la différenciation des MPP1 vers les MPP3 circulants. En plus de son rôle dans la migration thymique, CCR9 serait impliqué dans l'export vers le sang des progéniteurs hématopoïétiques.

Cependant, l'expression de CCR9 peut ne pas être suffisante pour permettre l'engagement des progéniteurs vers la voie de différenciation T mais uniquement pour la migration de ces dernières (ou s'il le fait, le signal n'est pas suffisant pour entraîner un réel engagement). En effet, environ 50% des CLP Flt3⁺ expriment CCR9 mais ne donnent pas de pré-T dans les souris athymiques.

En plus des molécules de migration présentées ici, les molécules d'adhésion (comme VCAM1) doivent elles aussi pouvoir influencer le devenir des cellules, en effet, la perte d'une de ces molécules peut permettre le détachement d'une niche pour aller vers une autre.

L'équipe de M. Kondo, lors de son étude sur l'identification des différentes sous-populations de MPP a prouvé qu'au cours de leur maturation, ces progéniteurs perdaient l'expression de VCAM1 (Lai et al., 2005). La perte de cette molécule permettant l'adhésion pourrait démontrer que les MPP3 ne sont pas dans la même niche que ces précurseurs. Il est alors intéressant de faire le lien entre le gain de récepteurs tel que CCR9 et PSGL1 et la perte de VCAM1. En effet, les données présentées ici démontrent que les progéniteurs de la MO au cours de leur maturation acquièrent l'expression de CCR9 et PSGL1 et perdent celle de VCAM1. Ceci permettrait alors de démontrer un gradient de concentration de chimiokines qui contrôlent l'expression des récepteurs et ainsi la migration des progéniteurs au travers des différentes niches de la MO.

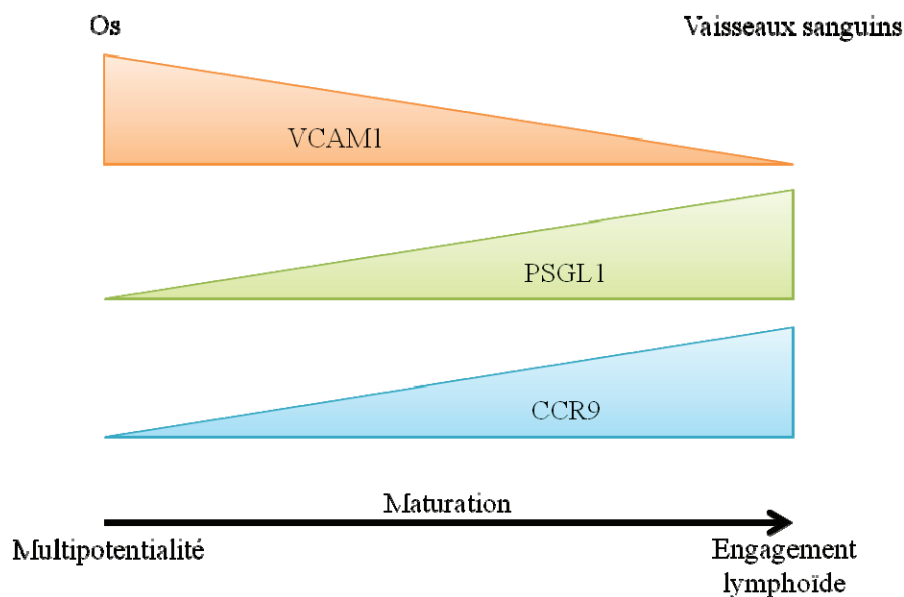


Figure 22 : L'expression de molécules liées à la localisation des progéniteurs et à leur devenir.

Les progéniteurs les plus proches de l'os expriment beaucoup VCAM1 et sont dans des niches profondes permettant la multipotentialité et certainement la maturation myéloïde alors que les progéniteurs destinés à un devenir lymphoïde et plus particulièrement au lignage T vont, grâce à l'expression de CCR9 et PSGL1, sortir de ces niches et migraient vers les vaisseaux sanguins où ils pourront coloniser le thymus.

Pour terminer, nous avons constaté que 12% des MPP3 de la MO exprimaient CCR9 alors qu'environ 55% de ces progéniteurs dans la circulation l'expriment. Trois hypothèses peuvent alors être émises :

- Les MPP3 CCR9⁺ migrent et prolifèrent dans la circulation.
- Les MPP3 CCR9⁻ vont exprimer CCR9 dans la circulation.

Ceci met en évidence l'importance de CCR9 pour la migration des progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation.

Les différentes molécules que nous venons de voir ici, et certainement d'autres qui reste à démontrer, sont impliquées dans la migration (ou la rétention) des progéniteurs de la MO de par leur expression. La concentration de leur ligand permet de diriger ensuite ces populations vers les sites où ces progéniteurs seront fonctionnels.

Conclusion et perspectives

Les résultats de nos travaux ont permis de mettre en évidence que les MPP3 (population de MPP majoritaire dans le sang) sont à l'origine des précurseurs T extra-thymiques même en absence de thymus. Les CLP, quant à eux, sont présents en circulation (surtout les CLP Flt3⁻) mais sont incapables de générer ces précurseurs. En effet, ils génèrent en majorité des lymphocytes B matures (CD19⁺IgM⁺) démontrant ainsi qu'ils n'ont pas de potentialité T intrinsèque ; ils ont besoin de l'influence du thymus pour pouvoir se différencier dans le lignage T.

Suite à ce travail, il reste encore des questions sur les mécanismes concernant l'engagement vers la voie de différenciation T. Récemment, un facteur de transcription Lyl1 a été mis en évidence comme étant un composant important dans le programme transcriptionnel qui contrôle la spécialisation lymphoïde et la maintenance des ETP (Zohren et al., 2012). Lyl1 est un facteur de transcription boucle-hélice-boucle important pour la génération des LMPP et ETP de façon dose dépendante comme on peut le voir dans la figure 23 qui présente les nombres absolus de différentes populations de la MO et du thymus dans la souris Lyl1^{+/+}, Lyl1^{+/-} et Lyl1^{-/-}.

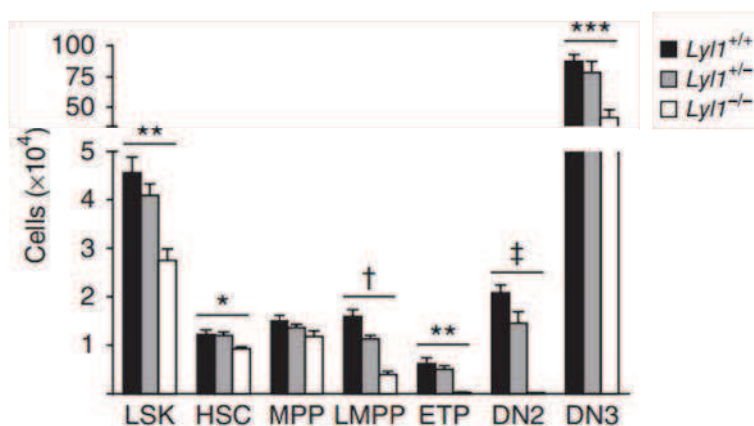


Figure 23 : Répartition des différentes populations de la MO et du thymus dans des souris Lyl1^{+/+}, Lyl1^{+/-} et Lyl1^{-/-} (Zohren et al., 2012).

Nombre absolu des LSK, HSC, MPP et LMPP de la MO et ETP, DN2 et DN3 du thymus chez les souris Lyl1^{+/+} (noir), Lyl1^{+/-} (gris) et Lyl1^{-/-} (blanc).

La diminution du nombre de LMPP ne résulte pas d'une augmentation de l'apoptose (annexine V) ni d'une diminution de la prolifération (BrdU). Lyl1 semble plutôt important pour l'engagement dans la voie lymphoïde T, en effet la capacité des LMPP à générer des cellules myéloïdes et B n'est pas altérée chez la souris mutante. Lyl1 est

dans le thymus requis pour la transition ETP à DN2 puisqu'une restauration du compartiment DN3 est observée suggérant des mécanismes compensatoires certainement de prolifération à ce stade (Zohren et al., 2012).

Ainsi, encore récemment des gènes essentiels au développement des lymphocytes T sont découverts démontrant l'importance de continuer les recherches sur ce sujet. De même, il est intéressant de suivre les avancées qui peuvent être faites dans les autres modèles d'études dont l'Homme (Lyl1 a originalement été découvert chez ce dernier comme étant altéré dans les leucémies T (Mellentin et al., 1989)).

Ainsi, AF1q a été démontré comme impliqué dans le développement des cellules T humaines (Parcelier et al., 2011). En effet, cette protéine va promouvoir la différenciation en lymphocytes T et inhiber celle des cellules B (ceci n'étant pas sans rappeler le rôle de Notch1). De plus, la transduction d'AF1q augmente l'expression d'Hes1 (gène cible de Notch) démontrant ainsi la capacité de cette protéine d'augmenter la susceptibilité des progéniteurs multipotents à la signalisation Notch et ainsi au devenir T (Parcelier et al., 2011).

Suite à ce travail sur la génération des précurseurs T extra-thymiques de la rate, il serait intéressant d'étudier cet organe (par immunofluorescence sur coupes) afin de connaître la (ou les) niche(s) où se trouve ces derniers. Ceci permettrait alors d'avoir une idée des mécanismes impliqués dans leur différenciation et leur maintien. En effet, comme nous avons pu le démontrer (figure 24), Notch1 est peu exprimé dans ces précurseurs par rapport aux thymocytes et il serait alors intéressant de connaître l'environnement dans lequel ils se trouvent afin d'identifier les facteurs produits.

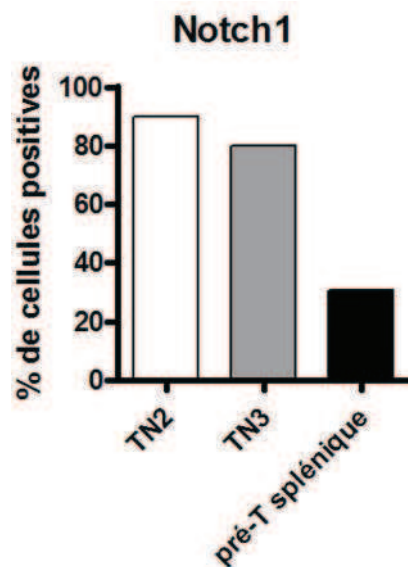


Figure 24 : Expression de Notch1 dans les précurseurs T extra-thymiques et thymocytes.

Pourcentage de TN2 (blanc), TN3 (gris clair) et pré-T splénique (noir) exprimant Notch1. 90 cellules individuelles ont été analysées.

Ces précurseurs extra-thymiques permettraient d'identifier les mécanismes d'engagement vers la lignée T en absence de thymus. De plus, nous sommes actuellement en train de mettre au point un multiplex avec Notch2 afin de savoir si sa signalisation aurait un rôle dans l'engagement des progéniteurs de la MO (MPP3) en précurseurs T extra-thymiques. L'engagement des précurseurs T intra-thymiques étant sous le contrôle de la signalisation Notch1 / Delta4, il est probable qu'en périphérie cet engagement soit sous le contrôle d'une autre interaction.

Annexe

La lymphopoïèse T, à la fin d'un long voyage à travers des sites et des potentialités multiples

T cell lymphopoiesis, the end of a long journey through multiple sites and potentialities

Amine Boudil
Vanessa Zepponi
Lamia Skhiri
Sophie Ezine

Inserm U1020,
Université Paris-Descartes,
Faculté de Médecine Necker,
156, rue de Vaugirard,
75730 Paris cedex 15
<sophie.ezine@inserm.fr>

Résumé. Au cours de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, la lignée des lymphocytes T est la dernière à être générée. Ce processus est responsable de l'absence d'une composante majeure du système immunitaire chez ces patients pendant un laps de temps entraînant des complications souvent fatales. Accélérer la reconstitution de cette voie lymphoïde permettrait de restaurer une immunité efficace et rapide. L'hématopoïèse précoce des lymphocytes T est tout à fait particulière, en ce sens que ces progéniteurs et leur descendance se situent sur plusieurs sites et que des intermédiaires de différenciation dans plusieurs organes existent. Par ailleurs, les gènes responsables de l'engagement irréversible dans cette lignée et leur coordination sont encore méconnus. En effet, contrairement à la lignée B, plus d'un gène est indispensable pour signifier la spécificité T. Enfin, le branchement de la voie T dans le schéma hématopoïétique général est encore incertain, plusieurs options étant sans cesse remises en question. Ainsi, une meilleure compréhension des facteurs et mécanismes impliqués dans la génération de la lignée T permettra de maîtriser sa production et d'accéder à des thérapies nouvelles.

Mots clés : thymus, facteur de transcription, chimiokine, progéniteur

Abstract. After the graft of hematopoietic stem cells, the reconstitution of the T cell lineage is very slow. This process is, thus, responsible of the absence of a major component of the immune system in these patients and of frequent deadly effects. Therefore, accelerating the reconstitution of the lymphoid T cell lineage would allow the restoration of an efficient immunity. T cell hematopoiesis present different characteristics compared to other lineages: progenitors and their products reside in different environments; thus, various intermediates of differentiation are detected in many organs. Moreover, genes responsible of the T cell engagement and their coordination are not known. Importantly, the initiation of the T cell lineage from the hematopoietic tree is not solved. Thus, a better understanding of the factors and mechanisms involved in the generation of the T cell lineage will allow the control of its production in order to have access to new therapies.

Key words: thymus, transcription factor, chemokine, progenitor

Contrairement aux autres lignées sanguines, les cellules T se développent à distance de la moelle osseuse, source de leurs progéniteurs. C'est dans le thymus que ce développement se déroule pour aboutir à la génération de cellules

T matures éduquées pour échapper aux processus auto-immuns. Par ailleurs, un nombre sans cesse croissant de progéniteurs est identifié dans plusieurs sites, intermédiaires probables de différentes populations en route vers leur destination ou appartenant à une même voie non encore identifiée.

doi:10.1684/hma.2011.0563

Tirés à part :
S. Ezine

Parce qu'il ne contient pas de cellules ayant la potentialité de s'auto-renouveler, le thymus doit importer périodiquement des progéniteurs hématopoïétiques. Sur ce site spécialisé, un réseau complexe de facteurs régulateurs va interagir pour inhiber les potentiels non T et produire le précurseur T (pré-T), à l'origine de tous les thymocytes. La compréhension des mécanismes qui contrôlent la génération des pré-T permettrait d'améliorer l'immunité cellulaire chez les patients âgés et de promouvoir la thymopoïèse pour augmenter les cellules T matures en périphérie. De plus, les méthodes récentes permettant de générer *in vitro* des précurseurs T vont ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques ; en effet, ces progéniteurs sont immédiatement compétents pour restaurer une réponse immune et peuvent être manipulés génétiquement pour le traitement des déficits immunitaires.

Origine de la voie lymphoïde T

Till et Mc McCulloch ont démontré que toutes les cellules du sang dérivent d'un type cellulaire unique, la cellule souche hématopoïétique (CSH) localisée dans la moelle osseuse [1]. Les CSH sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier [2]. Ce sont des cellules immatures qui n'expriment pas les marqueurs des cellules matures appelés « lignage » (Lin, Lineage). Spangrude *et al.* ont été les premiers à identifier le phénotype des CSH. Ce phénotype sert de référence pour identifier les populations hématopoïétiques chez la souris, Lin⁻ Sca-1⁺ (Stem-Cell Antigen) c-kit⁺ (récepteur à tyrosine kinase, c-kit, dont le ligand est le SCF (*stem-cell factor*) (LSK) [3].

Les voies de différenciation utilisées par les CSH pour passer d'un état multipotent vers des progéniteurs engagés ont été longtemps débattues pour la voie lymphoïde T et le sont encore. Au cours de l'hématopoïèse adulte, de multiples routes ont été décrites au cours desquelles les progéniteurs s'engagent dans des lignées ayant des potentiels de développement très distincts. Dans un premier temps, les CSH à long terme (LT-CSH : *long term*), douées d'auto-renouvellement et qui peuvent reconstituer le compartiment hématopoïétique de façon infinie, se différencient en progéniteurs à durée de vie plus limitée (ST-CSH : *short term*). Ces CSH donnent par la suite des progéniteurs multipotents (MPP) qui ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement et sont à l'origine de précurseurs de plus en plus restreints dans leur potentiel de développement. Un schéma initial de l'hématopoïèse avait postulé qu'après les MPP, deux voies sont possibles pour les progéniteurs : la voie de la lignée lymphoïde (CLP [*common lymphoid progenitor*] générant les populations B et T, NK [*natural killer*]) et celle de la lignée myéloïde (CMP [*common myeloid progenitor*] qui génère les granuleux-macrophages) (figure 1).

Cependant, de nouvelles données suggèrent un schéma de différenciation hématopoïétique différent. Dans ce nouveau schéma hématopoïétique, la population CLP descendrait

directement de la sous-population de MPP VCAM-1⁻ Flt-3^{high} (LMPP) [4, 5] ; ainsi, cette nouvelle population (LMPP [*lympho-myeloid progenitors*]) génère principalement les cellules de la lignée lymphoïde [6]. En amont, les MPP VCAM-1⁺ Flt-3^{low} vont perdre le potentiel mégacaryocyte/érythroïde (en produisant le CMP), avant de générer les LMPP. Ainsi, dans cette nouvelle configuration les granulocytes/macrophages seront issus des CMP et des MPP.

Plus récemment, une population de progéniteurs multipotents (MLP [*multilymphoid progenitor*]) possédant les capacités T, B, NK et myéloïdes a été identifiée chez l'Homme [7]. Ces données rejoignent celles obtenues chez la souris adulte rapprochant les lignées T et myéloïdes [6]. Cependant, ces travaux viennent d'être reconsidérés et les données récentes révèlent une séparation nette des lignées lymphoïdes et myéloïdes [8]. En effet, ici, les auteurs ont généré une souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du récepteur alpha de l'interleukine 7 (IL7r) (récepteur de cytokine le plus important lors de la lymphopoïèse) permettant de suivre le développement des lymphocytes. Ainsi, les cellules pro-T descendent de cellules ayant exprimé ce récepteur, contrairement aux cellules myéloïdes. Ceci permet de démontrer que les lignées lymphoïdes et myéloïdes ne partagent pas de progéniteurs communs.

La lymphopoïèse thymique

La thymopoïèse est un processus complexe et dynamique au sein d'une structure contenant des cellules épithéliales (originaires de l'endoderme) et un mésenchyme (originaire de la crête neurale). Ces tissus attirent des progéniteurs dont ils vont assurer la différenciation et la maturation fonctionnelle [9].

Avant l'établissement de la vascularisation, les progéniteurs migrent dans le mésenchyme avant d'atteindre le compartiment épithélial. Certains expriment des récepteurs pour les chimiokines (CCR7, CCR9 et CXCR4) [10]. Après vascularisation, un grand nombre de molécules sont retrouvées sur les progéniteurs récemment entrés dans le thymus [11]. En l'absence de cellules capables de s'auto-renouveler, ce recrutement est relativement continu [12]. La nature des cellules qui s'implantent dans le thymus et leur stade d'engagement vers le lignage T sont des questions encore débattues et qui pourraient trouver leur solution dans les nouveaux modèles du poisson zèbre [13].

L'accessibilité du thymus est contrôlée, à la fois par le nombre de progéniteurs intrathymiques présents [14] et la quantité de cellules T matures en périphérie [15]. Les travaux de Rossi *et al.* ont montré que l'interaction de la P-sélectine, exprimée par les cellules endothéliales, avec son récepteur PSGL1, exprimé par les progéniteurs T circulants, est l'une des premières étapes de la séquence de transmigration des progéniteurs à travers l'endothélium thymique [16]. Cependant, cette migration obéit aussi à des périodes

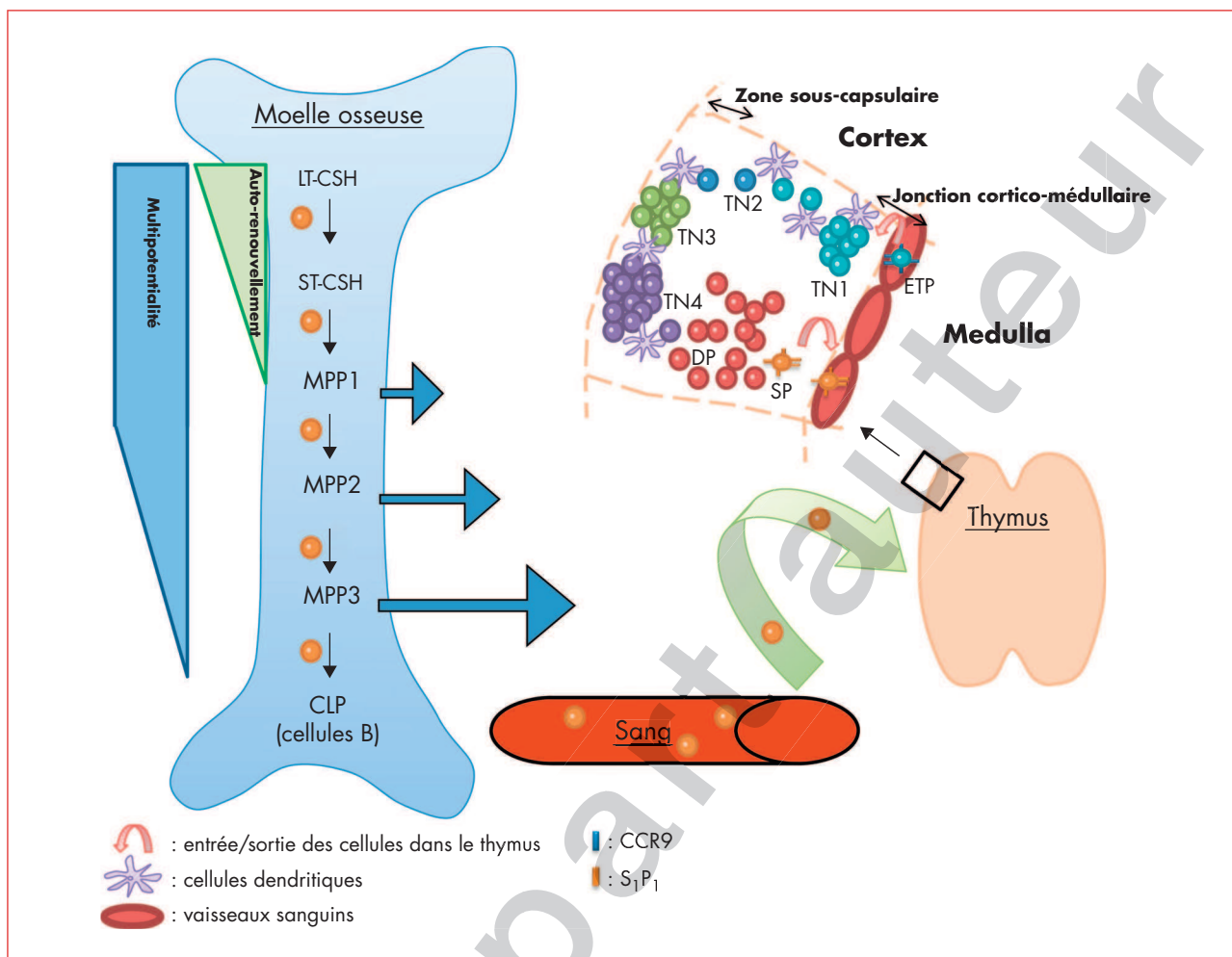


Figure 1. La lymphopoïèse T, des cellules souches de la moelle osseuse aux lymphocytes T du thymus.

LT-CSH : long term-cellules souches hématopoïétiques ; LSK (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺) CD34^{low} ; ST-CSH : short term-CSH, LSK CD34⁺ ; MPP : multipotent progenitor, LSK VCAM1⁺Flt3^{low} (MPP1), LSK VCAM1⁺Flt3^{low} (MPP2), LSK VCAM1⁺Flt3^{low} (MPP3) ; CLP : common lymphoid progenitor, Lin⁻Sca1^{low}cKit^{low}IL7R α ⁺.

alternativement réfractaires et permissives, suggérant un autocontrôle interne, probablement régulé par l'accessibilité des niches stromales [17]. Ceci alerte sur les conditions employées lors des études expérimentales de la thymopoïèse, toujours abordée après une irradiation et greffe de moelle osseuse.

Une fois dans le thymus, les chimiokines CCR7 et CXCR4 vont guider les progéniteurs au sein des différentes zones de cellules épithéliales [18]. La caractérisation et l'identification des molécules de migration vers le thymus font l'objet de nombreux travaux. Une des applications immédiate serait l'augmentation de la colonisation thymique chez les transplantés de moelle osseuse pour qui la régénération du compartiment T est très lente [19]. Ceci n'est envisageable qu'avec un thymus possédant une fonction résiduelle, ou à défaut après greffes d'épithéliums thymiques générés *in vitro*.

Ainsi, en plus de la génération de cellules T matures, un rôle essentiel du thymus est de restreindre à la lignée T les progéniteurs multipotents qu'il recrute (figure 1). Au cours de ce développement, les progéniteurs qui ont colonisé le thymus vont dans une première étape acquérir la compétence T et s'engager définitivement dans le lignage $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, au cours de la phase TN2-3 (voir ci-dessous), puis proliférer avant de subir les événements de sélection (phase DP, SP) qui vont aboutir à la formation des cellules T matures CD4⁺ et CD8⁺ capables de quitter le thymus et de coloniser les organes périphériques. Ainsi, la production de cellules T est caractérisée par la différenciation de vagues successives de progéniteurs ayant perdu leur auto-renouvellement. Dans le thymus, chaque progéniteur subit environ 20 divisions relativement symétriques pour générer un large pool de cellules immatures qui seront sélectionnées ; environ 12

de ces divisions se déroulent en 14 jours au sein de la population TN [20]. Chaque vague de différenciation dure environ 3 semaines.

La majorité des précurseurs intrathymiques n'exprime pas les marqueurs CD3, CD4 et CD8, et est donc appelée thymocytes triples négatifs (TN) (ou doubles négatifs DN [CD4, CD8]). Ils représentent 1 à 2 % des thymocytes totaux et sont subdivisés en 4 sous-populations selon le profil d'expression de la molécule d'adhésion CD44 et la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2, CD25 (IL2R α) [21, 22]. La population qui assure une thymopoïèse efficace et complète est ckit+ CD44⁺CD25⁻ (appelée ETP, 0,01 % du thymus); elle s'implante dans une niche située au niveau de la jonction cortico-médullaire, très vascularisée, et y sera abritée pendant 10 jours, au cours desquels une intense prolifération aura lieu [23]. Celle-ci est importante étant donné le faible nombre de cellules qui peut accéder à l'organe. Les ETP sont multipotentes, mais possèdent une activité B réduite ; les potentialités NK, DC et myéloïdes sont nécessaires pour assurer, au moins partiellement, la maturation de ces lignées dans le thymus (notamment la présentation d'antigènes assurée par des B, macrophages ou DC). Cependant, d'autres progéniteurs plus restreints (en termes de potentialités) contribuent aussi à la thymopoïèse. Ainsi, un environnement thymique fonctionnel est favorable au développement de plusieurs lignées qui soutiendraient (par la production de facteurs solubles et molécules d'adhérence ?) ce développement T. Lors des conditionnements pour les transplantations de moelle osseuse ces processus sont vraisemblablement altérés.

Les ETP se différencient en cellules TN2 et gagnent l'expression du marqueur CD25. Les TN2 génèrent ensuite les cellules TN3, CD44⁺CD25⁺, qui à leur tour se différencient en TN4 (CD44⁺CD25⁺). Durant cette progression, ces progéniteurs vont perdre séquentiellement les potentialités non T, et acquérir les caractéristiques de l'identité T. C'est chez la souris que ce développement a été le mieux étudié, mais des stades similaires sont retrouvés chez l'Homme [24]. Chacun de ces stades est le siège d'événements cruciaux pour l'engagement dans la voie T. En effet, les ETP ont un potentiel B réduit mais conservent leur potentiel de développement en cellules NK (NK1.1⁺) et en cellules dendritiques DC (CD11b⁺CD11c⁺), ainsi qu'un potentiel de génération de macrophages (CD11b⁺F4.80⁺) [25–27]. Les progéniteurs TN2 initient leur migration de la jonction cortico-médullaire pour se localiser au niveau de la partie interne du cortex, où elles y résident pendant 2 jours [23]. Aucune génération de lymphocytes B (CD19⁺) n'a été détectée, par contre ces cellules sont toujours capables de générer des cellules T et myéloïdes (CD11b⁺) [28]. À ce stade, l'expression de l'ARNm de *Rag1* est fortement augmentée et des réarrangements des loci du TCR- γ et du TCR- δ , ainsi que *DJ β* sont détectés [29, 30]. Nos travaux montrent que l'utilisation combinée des trois marqueurs (CD44, CD25 et cKit), permet d'identifier au sein de la fraction TN2 (CD44⁺CD25⁺), deux

intensités d'expression de cKit : cKithi (population TN2E) et cKitlo (population TN2L). Les profils de co-expression génique révèlent que la population TN2E est essentiellement *Rag1*-CD3 ϵ -pT α -, alors que la TN2L est *Rag1* \pm CD3 ϵ \pm pT α -. La population TN2L possède donc une signature T plus avancée : elle est dépourvue de potentialité DC et NK contrairement à la population TN2E, mais génère efficacement des lymphocytes T. Ainsi, la population TN2L représente le premier stade d'engagement vers la lignée T dans le thymus. Au stade TN3, seule la potentialité T est présente ; ces précurseurs T siègent dans le cortex externe et s'y multiplient. Toutes les cellules sont ckit CD25⁺ CD44⁻ et caractérisées par l'expression du pré-TCR en surface [31]. Les populations TN3 concentrent toute l'activité pré-T dans le thymus.

Ainsi, dès leur entrée dans le thymus, des mécanismes qui commencent à être élucidés vont renforcer le développement T et inhiber les autres potentiels. L'activation de la signalisation par le récepteur Notch1 et l'un de ses ligands est l'étape initiale à l'engagement T ; il n'est pas clair si ce signal est reçu dans le thymus ou à l'extérieur. L'absence de cette signalisation conduit au développement d'autres lignées dans le thymus [32, 33].

Développement lymphocytaire T *in vitro* et intérêts thérapeutiques

Le thymus représente donc un environnement spécifique pour le développement et la génération en très grand nombre de lymphocytes T à partir des progéniteurs de la moelle osseuse. Les multiples facteurs environnementaux impliqués ne sont pas encore identifiés. En fait, ces études ont longtemps souffert du manque d'un système de culture *in vitro*, contrairement au lignage B [34]. La présence de progéniteurs T était le plus souvent analysée *in vivo* après greffe de cellules d'intérêt à des animaux irradiés ou *in vitro* en culture organotypiques de lobes thymiques fœtaux. La culture des lobes thymiques (*fetal thymic organ culture* [FTOC]) permet aux CSH d'être différenciées en cellules T, dans un environnement tridimensionnel où l'on peut moduler les facteurs de croissance [35]. Cependant, ce système avait un certain nombre d'inconvénients : coût élevé, rendement cellulaire limité (peu de cellules étaient produites, et donc la culture de plusieurs dizaines de lobes était nécessaire) et longue durée d'expérimentation (préparation des gestantes contrôlées, prélèvement de lobes thymiques fœtaux à jours 12-14 de la vie embryonnaire, de plusieurs fœtus). Plus récemment, un autre système *in vitro* très performant a vu le jour.

L'échec des tentatives de production de cellules T en présence de lignées stromales dérivées de la moelle osseuse ou bien du thymus a montré la nécessité d'un ou plusieurs facteur(s). À la fin des années 1990, deux articles importants ont mis en avant le rôle de la signalisation Notch pour la spécificité T par rapport à B [36, 37]. Parallèlement, Schmitt

et Zúñiga-Pflücker ont constaté que le ligand de Notch, Delta-like 1 (Dll-1), est fortement exprimé par le stroma thymique du fœtus ; en revanche cette expression est complètement absente pour le stroma OP9 dérivé de la moelle osseuse. La lignée stromale OP9 était bien connue pour assurer la différenciation des cellules myéloïdes, B et NK après coculture avec des progéniteurs hématopoïétiques en présence d'une combinaison appropriée de cytokines et de facteurs de croissance [38, 39]. D'où l'idée de transformer la lignée cellulaire OP9 pour lui faire exprimer le ligand Dll-1: OP9-DL1 n'est plus capable de supporter le développement de cellules B à partir des CSH, mais a gagné la capacité d'inciter/de promouvoir l'engagement T *in vitro* avec une différenciation identique à celle observée dans le thymus [40]. Environ 2 000 à 5 000 fois plus de progéniteurs peuvent être obtenus selon cette technique. Les cellules stromales du thymus expriment fortement un autre ligand, Dll-4, qui semble jouer un rôle efficace dans le développement des cellules T, avec la capacité d'inciter le développement vers le lignage T de façon plus importante que Dll-1 [41]. Delta-like 4 est fortement exprimé dans la région sous-capsulaire et le cortex externe, alors que Dll-1 est plus fortement exprimé à la jonction cortico-médullaire, site d'entrée des progéniteurs [42]. Ces travaux indiquent aussi qu'à concentration de ligands faibles, Dll-4 est plus puissant à induire un développement T avec une inhibition de l'activité B. Dll-4 permet une activation significative du signal Notch des CSH et donc une meilleure activation des gènes cibles pour inciter l'engagement T. Ces découvertes ont permis la mise en place d'un système *in vitro* simple permettant de développer de façon importante des cellules T matures à partir d'une seule cellule progénitrice. Des résultats identiques ont été obtenus chez la souris avec des progéniteurs Lin- et chez l'Homme avec des progéniteurs CD34+ [43, 44]. Ainsi, la culture de CSH sur ces stromas OP9-Dll1 ou -DL4 en présence des cytokines IL-7 et FLT3-L génère un grand nombre de précurseurs T et NK, en 3 semaines environ et produit des T matures.

Contrairement à Dll-1, la force de liaison de Dll-4 avec les thymocytes immatures semble plus importante. Par ailleurs, il a été établi que l'interaction de Dll-4 avec son récepteur s'effectue plus fortement, entre les TN1 et TN3, ensuite elle diminue au stade TN4 et devient indétectable aux stades plus matures, DP et SP [45, 46]. Afin de mieux disséquer le rôle de Dll-4, les deux équipes de F. Ratdke et S. Habu ont permis d'établir une lignée de souris transgénique, chez laquelle le gène Dll-4 est inactivé de manière conditionnelle dans les cellules épithéliales du thymus (système *Foxn1-Cre*) [47, 48]. Ils ont ainsi démontré que cette délétion provoque un blocage complet du développement T au stade TN1, accompagné par un développement ectopique de cellules B dans le thymus.

En conclusion, même si Dll-1 et Dll-4 sont fonctionnellement redondants dans leur capacité à promouvoir le développement T *in vitro*, il est évident qu'*in vivo* Dll-4 est le partenaire physiologique de Notch1 dans le processus de la lympho-

poïèse T. Cette différence d'expression de Dll-4 dans le thymus pourrait constituer un gradient auquel l'intensité de l'interaction Dll-4/Notch1 augmenterait progressivement de la medulla vers le cortex. Ce gradient pourrait ainsi moduler la force de la signalisation Notch1 lors du passage des stades pro-T (ETP et TN2) au stade pré-T (TN3). Il serait ainsi impliqué dans l'induction graduelle de l'engagement vers la lignée des lymphocytes T, par la perte progressive des potentialités : B, myéloïde et NK.

La découverte du rôle clé joué par le récepteur Notch1 et ses ligands Dll-1 et Dll-4 dans l'engagement T, permettrait de pouvoir utiliser, dans la pratique médicale, les progéniteurs lymphoïdes pour augmenter la reconstitution T [49]. Cette approche peut accélérer la réponse immune et l'activité antitumorale chez les patients immunodéficients, tels que ceux sous forte chimiothérapie ou ayant subi une greffe de moelle osseuse allo- ou autologue. Ces progéniteurs protègent aussi contre les infections opportunistes rencontrées chez certains sujets infectés. Pour éviter de recontaminer ces progéniteurs générés *in vitro*, il est indispensable de manipuler génétiquement ces populations pour les rendre résistantes à l'infection du patient [50]. D'autres essais ont été réalisés dans des infections VIH [51] et des traitements antitumoraux [52].

La restauration d'un système immunitaire dépend aussi d'une structure thymique fonctionnelle. Ainsi, suite à une fonction thymique qui décline, plusieurs stratégies ont été utilisées afin d'augmenter la thymopoïèse : l'utilisation de facteurs de croissance et d'hormones (l'IGF1 [*insulin growth factor 1*], le KGF [*keratinocyte growth factor*], les interleukines 2, 7, 12 et 15 [53]. Ces traitements permettent de restaurer la capacité cellulaire d'un thymus en involution (vieillesse, conditionnement pour les greffes de cellules souches, radiothérapies, chimiothérapies, etc.).

La machinerie moléculaire de l'identité T

Contrairement à la différenciation des lymphocytes B où Pax5 a été intronisé comme « master gene » [54], aucun candidat équivalent n'a à ce jour été mis en évidence pour la lignée T. Cependant certains gènes ont déjà leur place dans le réseau qui va conduire à l'établissement de cette identité (*tableau 1*). En effet, avant d'atteindre son but (devenir une cellule pré-T au stade TN3), le progéniteur qui a colonisé le thymus va passer par toutes les autres potentialités depuis son entrée (stade ETP) jusqu'à ce stade (transition TN2-TN3).

La spécialisation T est initiée quand les progéniteurs rencontrent les ligands de la famille Delta-like du récepteur Notch1 dans l'environnement thymique ou en amont. Auparavant, dans la moelle osseuse, le passage de la CSH vers le progéniteur lymphoïde CLP, s'accompagne de la perte de l'expression de Gata2 et Lmo2 [55]. Le maintien de Lmo2 dans les thymocytes induit l'expression de plusieurs gènes

Tableau 1
Expressions et fonctions des facteurs étudiés dans la différenciation et l'engagement vers la lignée T

	Spectre d'expression	Effet de la délétion	Effet de la surexpression	Autres fonctions
Notch1	Forte expression de la protéine, des stades ETP à ISP, baisse aux stades DP et SP [135]	Délétion conditionnelle (<i>interferon-induced Mx-Cre</i>), blocage au stade TN1 et développement ectopique de cellules B dans le thymus [37]	Surexpression chez l'adulte, génération de cellules DP au niveau de la moelle osseuse et blocage précoce de la différenciation B [36]	Convertisseur du répresseur transcriptionnel RbpSuh (CSL) en activateur [46, 136]
DL-4	Large expression protéique dans les cellules épithéliales du cortex (cTEC) [47]	Délétion conditionnelle (système Foxn1-Cre), blocage total du développement T au stade TN1, développement ectopique de cellules B dans le thymus [47, 48]	ND	
Gata3	Large expression du gène, des stades ETP à SP (d'après nos résultats)	Blocage au stade TN1 [80] Délétion conditionnelle (Lox-Cre), blocage à la β -sélection (promoteur Lck) et la génération des T CD4 (promoteur CD4) [72]	Surexpression chez l'adulte, différenciation des HSC en mégakaryocytes [73] Surexpression chez le fœtus, reconversion des thymocytes en mastocytes [74]	Régulateur transcriptionnel des gènes Rag2, TCRs et CD8 [6-78]
Bcl11b	Induction du gène à partir du stade TN2E (d'après nos résultats)	Blocage au stade TN2 [93]	ND	
Hes1	Extinction du gène au stade TN4 (d'après nos résultats)	Chez le fœtus, blocage au stade TN1 [83]	Expression constitutive (promoteur Lck), génération de lymphomes T thymiques [85]	
E2a	Large expression du gène, de ETP à SP (d'après nos résultats)	Génération défectueuse du compartiment TN2 [137]	ND	Régulateur positif des gènes pT α et CD4 [138, 139]
Aml1	Large expression du gène, de ETP à SP (d'après nos résultats)	Délétion conditionnelle (<i>interferon-induced Mx-Cre</i>), blocage partiel au stade TN2 [140, 141] Délétion conditionnelle (Lck-Cre), blocage de la transition TN3-TN4 [142]	ND	Régulateur des éléments cis-régulateurs des TCRs [143, 144] Régulateur transcriptionnel des gènes CD4, Rag1 et Rag2 [142, 145-147]
Tcf7	Large expression du gène, de ETP à SP (d'après nos résultats)	Blocage sévère de la transition TN1/TN2, défaut de la β -sélection [94]	ND	Intéraction de TCF1 avec la b-caténine, par son domaine amino-terminal [148]
Gfi1	Expression génique aux stades thymiques précoces TNs (ND aux stades tardifs) [31]	Développement T partiellement bloqué entre la transition TN2-TN3. Compartiment TN1 dépourvu de cellules cKit ^{hi} IL-7R ^{lo} . Génération altérée des SP CD4, production soutenue de SP CD8 [105, 106]	ND	Régulateur négatif des gènes de la famille Id [106] Régulateur de l'activité transcriptionnel de PU1 par une interaction protéique directe [108, 149]
Pu1	Extinction du gène après la transition TN2L/TN3 (d'après nos résultats)	Chez le fœtus, blocage au stade TN1. Compartiment TN1 dépourvu de cellules c-Kit ⁺ [111]	Reconversion de pré-T thymique vers la lignée myéloïde [32]	
Ikaros1	Large expression du gène, de ETP à SP (d'après nos résultats)	Chez le fœtus, absence de développement T. Chez l'adulte, défaut sévère du développement T [150]	ND	Régulateur négatif des gènes cibles de Notch, pendant la transition TN-DP [102] Activateur du gène CD8 α [151]

associés normalement aux CSH et réprime les gènes T de différenciation [56]. Par ailleurs, la perte de Gata2 (qui joue un rôle dans le développement et la prolifération des CSH et MPP) est initiée dès les stades MPP, ce qui laisse la possibilité du branchement d'une voie lymphoïde à ce stade.

Dans le thymus, au sein des progéniteurs, la co-expression de Notch1 et d'autres partenaires à identifier, va se mettre en place. Ainsi au cours de leur différenciation, ces thymocytes vont devoir prendre plusieurs décisions : après s'être affranchi des potentiels de toutes les autres lignées sanguines, la cellule pré-T va continuer à faire des choix d'engagement dont le plus précoce sera celui de l'orientation vers les lignées $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, réalisé au cours de la transition TN2-TN3.

Le gène important pour l'engagement T est *Notch1*. La famille Notch comprend 4 récepteurs transmembranaires, représentatif d'une ancienne famille très conservée de régulateurs du développement décrite, dans un premier temps, pour son rôle dans la neurogenèse chez l'embryon de *Drosophila melanogaster* [57]. Seul Notch1 possède un rôle primordial dans les phases précoces du développement T (voir ci-dessus). Notch2 est plus fortement exprimé dans la moelle osseuse que Notch1, cependant Notch1 est plus fort dans les ETP. Il n'est pas encore clair si le rôle essentiel de Notch1 est fonction de la qualité ou de la quantité du signal.

Chez la souris, Notch1 et ses gènes cibles (CD25, Gata3, pT α , etc.) sont intensément exprimés dans les TN1-3 avant la phase de la sélection- β , par la suite, leur expression baisse de manière non négligeable [58, 59].

Les greffes par voie intrathymique et intraveineuse de cellules de moelle osseuse de souris déficientes pour Notch1, induisent un développement ectopique de cellules B dans le thymus des souris receveuses, alors que le développement T est bloqué dès le stade TN1 [37]. Par ailleurs, la transduction de progéniteurs par un vecteur rétroviral, qui code pour une forme de Notch1 constitutivement active (Notch1IC), génère des cellules DP (CD4+CD8+) au niveau de la moelle osseuse et un blocage précoce de la différenciation B.

La capacité du signal Notch à bloquer l'accès aux voies de différenciation myéloïde et DC a été clairement établie, même dans des conditions de surexpression de facteurs myéloïdes comme *C/EBP* et *Pu1* [32, 33]. En réponse à la surexpression de *Pu1*, l'impact immédiat de Notch est de maintenir l'expression des facteurs de transcription nécessaires au stade pro-T. Cela peut être interprété comme un effet « protecteur » des gènes T par Notch, contre une potentielle baisse d'expression médiée par *Pu1*. Ce mécanisme protecteur s'étend à plusieurs gènes T, codant pour des facteurs de transcription, comme *C-myb*, les protéines *E*, *Bcl11b*, *Gfi1* et *Tcf1*. Aux stades plus tardifs, les molécules de la famille Notch jouent un rôle plus complexe, à la fois au cours des événements de sélection dépendants du TCR et la différenciation des cellules T matures en périphérie. Des essais *in vitro*,

ont montré que l'interaction Notch/Delta est nécessaire au niveau de la β -sélection, pour à la fois soutenir la prolifération et la différenciation, complétant ainsi les signaux générés par le pré-TCR [60–62].

Les protéines E sont des régulateurs positifs de la transcription de Notch1 au cours du développement des thymocytes [63, 64]. Ainsi, les lignées E2 α -/- présentent une forte réduction de l'expression de Notch1 et de ses gènes cibles (Hes1, Deltex, pTCR α , CD25); de plus les CSH- E2 α -/- ne génèrent pas de cellules T en culture sur un stroma compétent OP9-DL1. Par ailleurs, la signalisation par le pré-TCR augmente l'expression de Id3 dans les TN3 et inhibe l'activité des protéines E, conduisant rapidement à une diminution de la transcription de Notch1 [65]. Un des régulateurs négatifs de Notch1 est la protéine p53 [66].

Un gène cible de Notch1, Gata3, est impliqué dans l'engagement T mais sa fonction n'est pas encore déterminée. Gata3 est un facteur de transcription à doigts de zinc qui lie l'ADN au niveau d'une séquence spécifique composée d'une série de quatre nucléotides, GATA [67]. Les souris Gata3 KO sont létales, au cours de la gestation à cause de malformations cardiaques [68]. Des oligonucléotides antisens inhibent le développement T, de précurseurs du foie fœtal, *in vitro* [69]. Ainsi, Gata3 a été considéré pendant longtemps comme le gène de l'engagement vers la lignée T. Il contrôle aussi directement ou indirectement le développement des cellules T [70] et des NK thymiques [71]. Il est indispensable pendant la phase de β -sélection au stade TN3 (CD44-CD25+) et pour la génération des cellules T CD4+ matures [72].

En dépit de son implication dans la progression du processus de différenciation T, Gata3 n'est pas un simple gène équivalent aux gènes « clés » spécifiques de lignée comme, Gata1 pour les érythrocytes et Pax5 ou Ebf pour les cellules B. L'expression forcée de Gata3 dans les CSH n'améliore pas le processus de différenciation T : elle le bloque complètement. La forte expression de Gata3 dans les CSH de souris adultes induit une différenciation en mégacaryocytes [73], alors que dans les thymocytes précoces du fœtus, cela induit une différenciation en mastocytes [74]. La conversion en mastocytes est efficacement bloquée par le biais de la signalisation Notch1. Quand l'interaction Notch-Delta se produit, l'expression forcée de Gata3 bloque la survie des cellules, induisant ainsi la rupture du processus de différenciation en mastocytes.

Cette surexpression de Gata3 provoque temporairement une forte baisse d'expression de Pu1 dans les ETP et TN2, et une augmentation de l'expression du gène « mastocyte » MITF (microphthalmia associated transcription factor), ainsi que des deux autres membres de la famille GATA, Gata1 et Gata2. Par la suite, d'autres gènes codant pour des facteurs de transcription « mastocytes » sont induits, SCL (Tal1) et Gfi-1b, alors que les gènes T sont encore plus réprimés.

L'émergence de cellules viables est alors dépendante du retrait du signal Notch. Les cellules acquièrent ainsi un phénotype de précurseurs de mastocytes $c\text{-Kit}^{\text{hi}}\text{Thy-1}^{\text{lo}}\text{CD27}^-$. Ces cellules achèvent leur maturation en présence de cytokines spécifiques aux mastocytes et acquièrent le phénotype $\text{Fc}\gamma\text{RI}^+$. Dans des conditions normales, le facteur clé responsable de l'initiation de la différenciation des mastocytes est Gata2. Vu la forte homologie des séquences peptidiques entre GATA2 et GATA3, l'expression de GATA3 à fortes doses pourrait mimer la fonction de GATA2 et permettre d'ouvrir l'accès à la voie des mastocytes en activant des gènes, normalement régulés par GATA2.

Gata3 est potentiellement un candidat « gardien » de l'identité T : il serait capable d'exercer une action antagoniste sur l'option myéloïde dans un contexte normal. La conversion vers la voie myéloïde, sous l'influence de la surexpression de facteurs de transcription myéloïdes comme *C/EBP* et *PU.1*, est inhibée par la co-expression de *Gata3* [32] : l'augmentation du niveau d'expression du gène codant pour le marqueur myéloïde Mac-1 (CD11b) est bloquée. Toutefois, dans cette étude, il reste à définir comment *Gata3* inhibe l'option myéloïde : est-ce qu'il agit en empêchant une baisse d'expression de *Notch* et des protéines E, qui sont requises pour un développement T complet ?

L'établissement d'une lignée de souris exprimant le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur de *Gata3*, a permis de montrer que son expression augmente dans le thymus, une première fois, au cours de la phase de β -sélection et une deuxième fois, au cours de l'engagement vers la voie des cellules matures CD4^+ [75].

Gata3 joue un rôle fonctionnel : il est impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes nécessaires à la lignée T, en fixant directement le promoteur de *Rag2*, les enhancers de *TCR* et une région régulatrice de *CD8* [76-78].

La signalisation *Notch1* est nécessaire pour la fonction de *Gata3* et cette signalisation, seule, n'est pas suffisante pour assurer la spécialisation T [79].

Une étude récente a montré que l'activité du gène *Gata3* était essentielle au stade ETP, et qu'il n'avait aucun rôle dans la survie et la prolifération de ces progéniteurs [80]. Ainsi, même si *Notch1* est exprimé avant *Gata3* dans les progéniteurs médullaires, que toutes les ETP co-expriment ces 2 gènes, la relation *Notch1*-*Gata3* reste encore peu claire.

Un autre facteur dont l'expression est augmentée dans les progéniteurs dès leur entrée dans le thymus, est *Hes1* (*hairy and enhancer of split 1*), un des gènes cibles de *Notch*, un facteur de transcription de la famille bHLH. Il agit en homodimère pour exercer une fonction de répresseur transcriptionnel, en se fixant sur des régions appelées N boxes et en recrutant un autre répresseur transcriptionnel Groucho [81, 82]. La souris *Hes1* déficiente meurt pendant la gestation suite à un défaut dans le développement du système nerveux. Quatre-vingt-dix pour cent des embryons KO sont

dépourvus de thymus, alors que chez les 10 % restants, la taille du thymus est très réduite. Aucune cellule T mature n'est détectable dans ces thymus. Les données obtenues à partir de la souris déficiente pour *Hes1* indiquent que ce facteur est requis pendant le développement T [83]. Les souris reconstituées avec des cellules du foie fœtal *Hes1KO*, ont un compartiment T complètement bloqué au stade TN1. Par ailleurs, la surexpression de *Hes1* par transduction rétrovirale de progéniteurs de moelle osseuse, montre l'absence de développement des lignées myéloïde et B chez les souris receveuses alors que le compartiment des cellules T est efficacement reconstitué avec une distribution normale entre les SP CD8 et SP CD4 [84]. Ainsi, *Hes1* pourrait avoir un rôle dans la prolifération plutôt que l'engagement vers le lignage T.

Enfin, l'induction d'une expression constitutive de *Hes1* dans le thymus, par la génération d'une lignée de souris transgénique dont l'expression de *Hes1* est sous le contrôle du promoteur *Lck*, génère des lymphomes thymiques de cellules T matures avec une faible pénétrance ; dans ces cellules, la surexpression d'*Hes1* augmente les niveaux d'expression des gènes *Notch1*, *Notch3* et *C-myc* [85]. *Hes1* possède une activité oncogénique et pourrait donc augmenter le pouvoir tumorigène des gènes qu'il active.

Un troisième gène, *Bcl11b*, vient de rentrer dans cette catégorie, grâce à la génération de souris mutantes. *Bcl11b* (*Rit1/Ctip2*) est un gène suppresseur de tumeur. Il a été identifié par son implication dans l'induction de lymphomes thymiques, induits par des rayons gamma [86, 87]. Chez l'Homme, il existe des recombinaisons chromosomiques aberrantes au niveau du locus *Bcl11b*, trouvées de façon récurrente dans les leucémies T [88, 89]. *Bcl11b* code pour un membre de la famille des protéines à doigts de zinc [86] et interagit avec le complexe de déacétylase d'histones, dont le facteur *Sirt1*, impliqué dans le remodelage du nucléosome, qui représente l'un des complexes majeurs de répression transcriptionnelle chez les cellules de mammifères [90]. Toutefois, les gènes cibles de *Bcl11b* ne sont pas connus. Sa délétion dans la lignée germinale altère les phases précoces du développement T causant un blocage au stade TN3 et une augmentation de l'apoptose reflétée par un nombre de thymocytes très réduits [86]. Sa surexpression contribue à une augmentation de l'expression de la chimiokine *CCR9* dans l'embryon de poisson [91]. L'expression de ce gène est détectée dans la population TN2, et persiste ensuite au cours de la thymopoïèse ; les niveaux d'expression les plus élevés sont détectés dans les progéniteurs thymiques. La délétion de *Bcl11b* dans ces progéniteurs entraîne la génération de cellules NK dans le thymus et l'expression des gènes T spécifiques (*Notch1*, *Gata3*, *TCF1*) est très réduite [92]. Ainsi, son expression empêche les cellules T de s'engager dans le lignage NK. *Bcl11b* est donc appelé « gardien de l'identité T ». La concentration en IL7 pourrait jouer un rôle dans la surexpression de ce facteur [93].

Le facteur TCF1 (*T cell Factor-1*) et son partenaire LEF1 (*lymphoid enhancer factor-1*) sont les effecteurs nucléaires de la voie Wnt. Ils sont requis à la fois au cours de la phase de transition TN1/TN2 et la β -sélection [94]. Chez la souris, la fonction de TCF1 devient de plus en plus importante en fonction de l'âge, pour la génération de vagues de précurseurs T qui puissent atteindre le stade TN2 [95]. En réponse à la signalisation de Wnt, la β -caténine migre dans le noyau et converti TCF1 de répresseur par défaut à activateur [96, 97]. Si ces antagonistes de la voie Wnt sont introduits, la différenciation T est alors bloquée dès le stade TN1. Il n'a pas été encore démontré si le complexe TCF1/LEF1 fonctionne en activant les gènes de l'identité T. Les microarrays réalisés ont montré que l'activation de la voie Wnt dans les thymocytes induit surtout l'expression des gènes du cycle cellulaire et ceux codant pour les molécules d'adhésion [98]. En absence de TCF1, la cellularité thymique chute ; il pourrait servir à réguler IL7R α , BCL-XL et les facteurs T spécifiques CD3e et CD4.

Une étude clé de l'équipe de Tenen a mis en évidence un élément cis-régulateur « bifonctionnel » de l'expression du gène Pu1 [99]. À travers cet élément, TCF1 pourrait contrôler à la fois l'expression précoce de Pu1 et sa répression plus ultérieurement, au cours du développement T. Pu1 peut lui-même réprimer l'expression du gène TCF1 [33]. Cela implique qu'au cours de la transition TN2-TN3, les deux régulateurs transcriptionnels Pu1 et Tcf1 s'opposent l'un à l'autre dans un cycle de répression mutuelle pour déterminer le choix d'engagement vers la lignée T versus celle des DC. Puisque l'extinction de Pu1 au stade TN3 coïncide avec une augmentation des niveaux d'expression des gènes spécifiques à la lignée T, le complexe TCF1/Lef1 pourrait vraisemblablement participer à la régulation positive des gènes.

De concert avec Notch, Ikaros joue aussi un rôle clé [100].

Ikaros1 : au moins deux autres membres (Aiolos et Hélios les mieux connus) de cette famille sont exprimés dans le thymus, en partie de façon continue depuis les stades de progéniteurs hématopoïétiques. La lignée de souris déficiente pour Ikaros1 n'a pas de développement T au stade foetal mais présente un développement T au stade postnatal [101].

Il semble donc que le facteur Ikaros1 soit indispensable pour le développement T au cours de la vie foetale, mais que des mécanismes partiellement compensatoires se mettent en place à partir de la naissance. Cependant, ces hypothétiques mécanismes ne sont pas suffisants au cours de la vie adulte puisque les étapes de prolifération aux stades TN et DP sont altérées, le nombre de cellules TN3 est largement diminué et la différenciation est complètement dirigée vers la lignée SP CD4.

Georgopoulos *et al.* ont produit des souris, dont le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Ikaros a été supprimé [101]. Ces souris expriment donc une protéine Ikaros non fonctionnelle appelée dominant négatif (DN de la protéine Ikaros). Ces souris Ikaros DN KO meurent en 3 semaines

d'infections graves et aucune cellule T, B, NK ou DC n'est générée.

Les cellules DP Ikaros KO ne prolifèrent pas, indiquant que la protéine Ikaros est également importante pour la prolifération en réponse à la signalisation du TCR β . Ainsi, Ikaros serait impliqué dans la signalisation du TCR. D'autre part, les souris Ikaros KO meurent en 3 mois de lymphomes T, cela suggère qu'Ikaros est un gène suppresseur de tumeur en présence de la signalisation du TCR. Une étude récente a montré qu'Ikaros peut réprimer la transcription des gènes cibles associés à Notch ; cela contribue probablement à sa fonction de suppresseur de tumeur [102].

Les gènes suivant participent à la mise en place du programme T, soit parce que leur extinction inhibe la phase TN2 (Gfi1), soit parce qu'ils se maintiennent avec une faible expression durant cet engagement (Pu1).

Gfi1 : le facteur de transcription Gfi1 est important à la fois pour le développement des cellules T, des DC et des neutrophiles [103, 104] : leur génération est fortement altérée chez les souris déficientes pour ce gène.

Chez la souris Gfi1 déficiente, le développement T est partiellement bloqué entre la transition TN2-TN3, alors que le compartiment TN1 est dépourvu de cellules de phénotypes cKit^{hi}IL-7R^{lo} [105, 106]. De plus, cette souris présente une production altérée de cellules SP CD4 et une production soutenue de SP CD8, en comparaison avec la souris sauvage. Ces perturbations sont concordantes avec le profil d'expression de Gfi1 dans le thymus, qui est induit dans les cellules TN2 et persiste jusqu'au stade DP [107]. Gfi1 pourrait être impliqué dans la répression de l'expression des membres de la famille Id, puisque dans le thymus de souris Gfi1^{-/-}, les gènes Id2 et Id1 sont exprimés de manière aberrante, à des niveaux très élevés [106]. Il semblerait que Gfi1 interfère avec l'activité transcriptionnelle de Pu1 par une interaction protéique directe [108]. Dans le contexte du développement T, il est possible que Gfi1 soit utilisé de façon analogique pour maintenir l'identité T s'opposant à la fois à Pu1 et Id2, pour réprimer respectivement les autres alternatives du développement DC et NK.

Pu1 : Pu1 possède un double rôle, il est en effet impliqué à la fois dans la différenciation myéloïde et lymphoïde [109]. À fortes doses d'expression, Pu1 induit une différenciation myéloïde alors qu'à faibles doses, il favorise une différenciation vers la lignée des lymphocytes B, par l'induction de l'expression de l'IL7R α [110].

La lignée de souris Pu1 déficiente est létale au stade périnatal, suite à une forte altération de l'ensemble du système hématopoïétique, observée également au stade foetal [111-113]. Concernant le développement T, il a été démontré que la souris déficiente pour le gène Pu1 présente un défaut dans la génération des lymphocytes T. Toutefois, son expression dans les thymocytes est exclusivement restreinte aux stades précoces TN1 et TN2 et il semble qu'elle soit

hautement corrélée avec le potentiel myéloïde maintenu à ces stades [25, 114]. Les thymocytes Pu1 déficients ne peuvent pas générer de DC *in vitro* [115]. Aux stades thymiques plus tardifs, où Pu1 est éteint, la transduction de Pu1 restaure la capacité de développer des monocytes/DC [32, 33, 115, 116]. Ainsi, tant que Pu1 est exprimé, il a la capacité de préserver le potentiel myéloïde aux stades pro-T TN2. Quand l'expression de Pu1 est forcée aux stades TN2 et TN3, il a la capacité de « démanteler » l'identité T des thymocytes. Au premier jour post-transduction, Pu1 fait baisser légèrement l'expression de plusieurs gènes T [33]. Cet effet répressur est accompagné d'une augmentation de l'expression du gène myéloïde CD11c. Ainsi, l'un des rôles de Pu1 *in vivo* serait de ralentir le processus de différenciation T pendant la phase intensive de prolifération aux stades pro-T. La surexpression de Pu1 dans les TN2 et TN3 ne permet pas la reconversion de ces cellules si elles reçoivent un signal continu de Notch1 [32, 33]. Sous ces conditions, elles peuvent se développer en DP. Ainsi, Notch peut moduler la réponse à la surexpression de Pu1. Le rôle du signal Notch consisterait donc à protéger les gènes de l'identité T contre l'effet suppresseur de Pu1.

Comme mentionné au début, les populations ETP, TN2 et TN3 sont dépourvues de potentialité B, ce qui démontre que cette activité est réprimée rapidement après l'entrée dans le thymus. Notch pourrait induire directement ou indirectement l'extinction des gènes EBF1 et Pax5, gènes B spécifiques [117]. La suppression des autres potentiels est orchestrée par Notch et ses gènes cibles suivant une chorégraphie qui reste encore à déterminer ; elle doit aussi mettre en valeur ses partenaires et la dose à laquelle ils interviennent.

Les précurseurs extrathymiques et les fuites du thymus

Plusieurs précurseurs peuvent être retrouvés en circulation, déjà restreints à la lignée T avant leur entrée dans le thymus, et présents dans différents organes (dont les ganglions, le sang, la moelle osseuse, la rate et l'intestin) ce qui suggère qu'il existe des environnements extrathymiques favorables à la génération, la survie et la prolifération des précurseurs T. Ces précurseurs doivent coloniser le thymus pour terminer leur différenciation en cellules T matures. Il est ainsi possible qu'ils contribuent au développement T en contournant les premières étapes de différenciation intrathymique (figure 2, tableau 2).

Dans la MO, des précurseurs T capables de générer des cellules T matures et fonctionnelles (CD4⁺ et CD8⁺ TCRαβ⁺) après culture pendant 48 h ont été identifiés par l'équipe de S. Strober [118]. Cette population a pour phénotype Lin⁻ Sca1^{low} cKit^{low} IL7Rα^{low} CD44⁺ Thy1⁺ CD2⁻ [119]. Un autre travail identifie, après greffe de moelle osseuse, des précurseurs T dans la rate [120, 121]. Des précurseurs

de phénotypes identiques sont aussi retrouvés dans la rate de souris (C57Bl6) et nude (souris athymique) non manipulées. La sous-population de ces précurseurs Lin⁻Thy1⁺ CD25⁺ ne génère *in vitro* que des cellules T et est donc complètement restreinte à la lignée T. Cette population est ainsi engagée dans la lignée T indépendamment du thymus mais doit compléter sa différenciation T dans le thymus [122]. La présence des ligands Delta-like 1 dans la rate permet la génération de précurseurs T, celle de Delta-like 4 dans l'épithélium thymique permet d'assurer la différenciation en cellules T matures [41].

Des précurseurs T ont été aussi caractérisés dans le sang fœtal de souris contrôles [123] et le sang adulte de souris transgéniques [124]. Des phénotypes similaires sont retrouvés Lin⁻ Sca1⁺ cKit^{low} IL7Rα^{low} CD44⁺. Une seule étude a décrit chez les souris transgéniques exprimant l'oncostatine M, une population de précurseurs c-kit^{low} IL7Rα⁺ qui sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire à un stade CD44⁺ CD25^{low} (TN1) [125]. Par ailleurs, à la base de certaines cryptes intestinales, de petits agrégats d'environ un millier de cellules lymphoïdes appelées cryptoplaques, Saito *et al.* ont retrouvé des cellules immatures de phénotype Lin⁻ Thy1⁺ c-kit⁺ IL7Rα⁺ CD25⁺. Ces progéniteurs, *in vivo*, génèrent des LIE (lymphocytes intra-épithéliaux) de façon thymo-indépendante [126]. Il est impossible d'affirmer si l'ensemble des précurseurs décrits ci-dessus sont des intermédiaires d'une même voie de différenciation ou s'ils proviennent de voies différentes (car ces différentes populations possèdent des marqueurs communs). Ces différents précurseurs extrathymiques pourraient constituer des compartiments de réserve en cas de lymphopénie, permettant une génération T plus rapide après colonisation du thymus que celle réalisée par les précurseurs pluripotents de la moelle osseuse, d'où leur intérêt majeur en thérapie. Ainsi, l'origine des précurseurs T extrathymiques et leur relation aux précurseurs intrathymiques nécessitent d'autres travaux.

Le thymus a toujours été considéré comme un site d'export de cellules T matures, or il a récemment été démontré que des progéniteurs T Lin⁻ CD44⁺ pouvaient sortir du thymus et coloniser les organes lymphoïdes [127, 128]. L'export des thymocytes matures s'effectue au niveau de la jonction cortico-médullaire [129]. Les thymocytes exportés rejoignent la circulation sanguine, lymphatique, ou probablement les deux à ce niveau. L'expression de S1P₁ est fortement augmentée au niveau de la transition entre les thymocytes DP et les thymocytes SP les plus matures [130, 131]. Le récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate, S1P₁ (sphingosine-1-phosphate receptor 1), couplé aux protéines G, est impliqué dans le développement du système vasculaire [132] et est nécessaire à l'export des lymphocytes T du thymus [131]. Son ligand, la S1P (Sphingosine-1-Phosphate), est présent à plus forte concentration dans le sang et la lymphe que dans les tissus lymphoïdes. Il semble que l'export des thymocytes soit médié par un gradient de

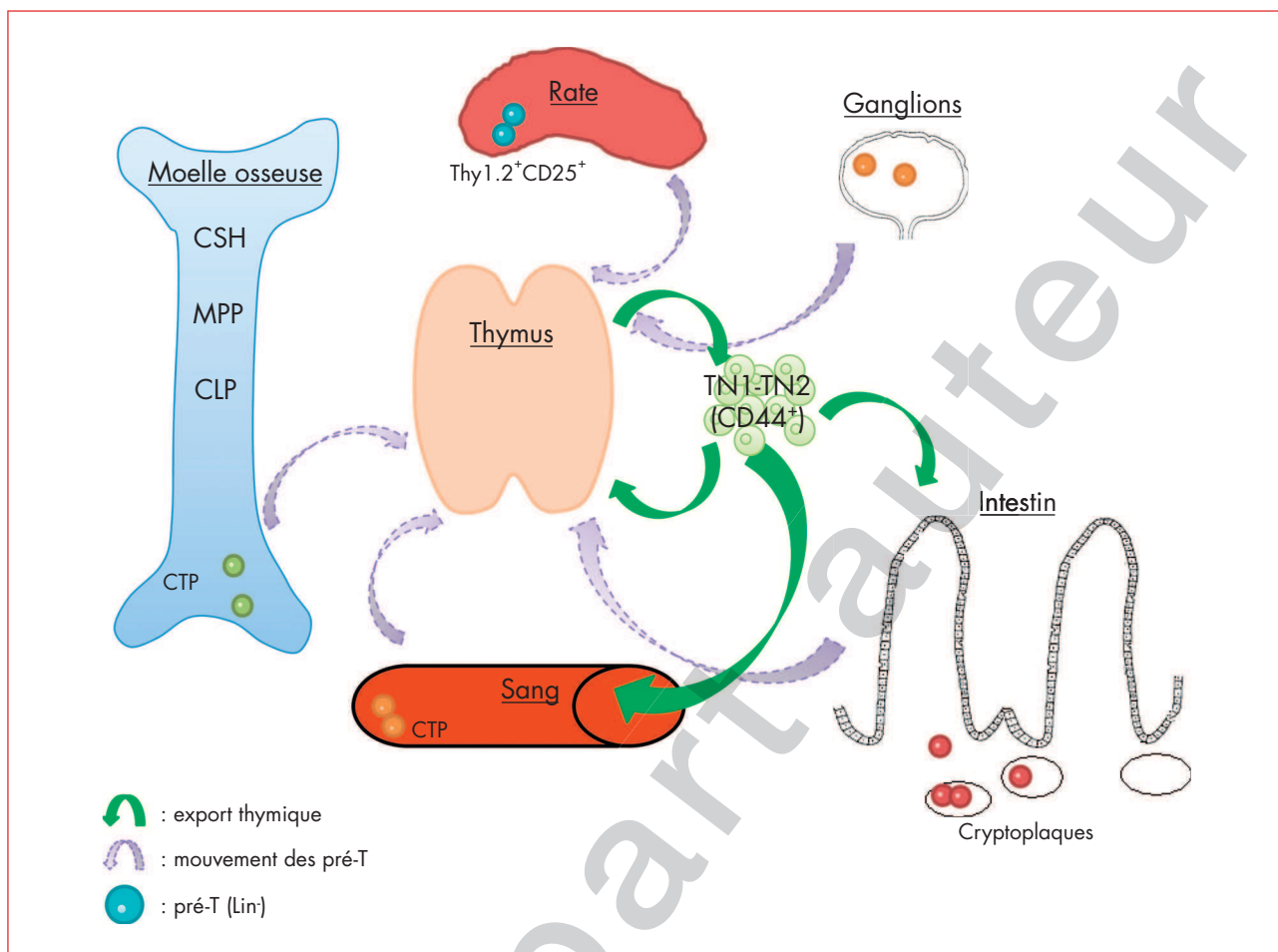


Figure 2. Les différents précurseurs des cellules T et les fuites de thymocytes immatures du thymus.

Tableau 2
Localisation, phénotype et fonctions des progéniteurs des lymphocytes T

Localisation	Phénotype	Potentialité	Fonction	Références
Rate	Lin ⁻ Thy1.2 ⁺ CD25 ⁺	T	Plus présentes dans les souris nues que sauvages Environ 10 % exprime CCR9	[120-122]
MO	Lin ⁻ Sca1 ^{low} cKit ^{low} IL7Rα ^{-/low} CD44 ⁺ Thy1 ⁺ CD2 ⁻	T, NK	Génère T mature et fonctionnel	[118, 119]
Sang	Lin ⁻ Sca1 ⁺ cKit ^{low} IL7Rα ^{low} CD44 ⁺ Flt3 ⁻	T, NK	Souris transgéniques pTα/hCD25 Exprime CCR9	[124]
Ganglions	Lin ⁻ c-kit ^{low} IL-7Rα ⁺	T	Souris transgéniques exprimant l'oncostatine M Bloqués en phase G1 au stade CD44 ⁺ CD25 ^{low}	[125]
Intestin	Lin ⁻ Thy1 ⁺ c-kit ⁺ IL-7Rα ⁺ CD25 ⁺	LIE, T	Thymus indépendant	[126]
Sang fœtal	Lin ⁻ Thy1 ⁺ c-kit ^{low} CD3 ⁻	T		[123]

S1P (établi par l'activité de la S1P lyase) [133, 134]. La régulation des molécules qui participent à la migration hors du thymus est encore inconnue.

Conclusion

Ainsi, une sous-population de progéniteurs encore à caractériser, quitte la moelle osseuse pour entrer dans le thymus et initier le développement de la lignée T. Au cours des étapes extra- et intrathymiques, les potentiels non T sont graduellement perdus sous le contrôle des facteurs de transcription et des signaux de l'environnement. L'engagement final dans la voie T est acquis/complété dans le thymus. Plusieurs questions sont encore non résolues. Quels sont les signaux responsables de la sortie du compartiment médullaire et de l'entrée dans le thymus ? Quels sont les mécanismes qui éliminent les potentialités non T ? Sont-ils tous différents ? Les travaux futurs apporteront certaines réponses qui nous permettront d'avancer dans les connaissances de la lymphopoïèse T. ■

Conflits d'intérêts : aucun.

RÉFÉRENCES

1. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961 ; 14 : 213-22.
2. Wu AM, Till JE, Siminovich L, McCulloch EA. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 1967 ; 69 : 177-84.
3. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988 ; 241 : 58-62.
4. Lai AY, Lin SM, Kondo M. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* 2005 ; 175 : 5016-23.
5. Lai AY, Kondo M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 1867-73.
6. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005 ; 121 : 295-306.
7. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunology* 2010 ; 11 : 585-93.
8. Schlenner SM, Madan V, Busch K, et al. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity* 2010 ; 32 : 426-36.
9. Rodewald HR. Thymus organogenesis. *Annual Review of Immunology* 2008 ; 26 : 355-88.
10. Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, et al. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *European Journal of Immunology* 2007 ; 37 : 2090-6.
11. Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H, von UH, Andrian UH. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 ; 103 : 7006-11.
12. Wallis VJ, Leuchars E, Chwalinski S, Davies AJ. On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimaeras. *Transplantation* 1975 ; 19 : 2-11.
13. Kissa K, Murayama E, Zapata A, et al. Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood* 2008 ; 111 : 1147-56.
14. Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nature Reviews* 2003 ; 3 : 859-66.
15. Gossens K, Naus S, Corbel SY, et al. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *The Journal of Experimental Medicine* 2009 ; 206 : 761-78.
16. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nature Immunology* 2005 ; 6 : 626-34.
17. Foss DL, Donskoy E, Goldschneider I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *The Journal of Experimental Medicine* 2001 ; 193 : 365-74.
18. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews* 2006 ; 6 : 127-35.
19. Clave E, Busson M, Douay CR, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009 ; 113 : 6477-84.
20. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 1990 ; 2 : 3-12.
21. Godfrey DI, Zlotnik A. Control points in early T-cell development. *Immunol Today* 1993 ; 14 : 547-53.
22. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature Immunology* 2003 ; 4 : 168-74.
23. Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual Review of Immunology* 2007 ; 25 : 649-79.
24. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annual Review of Immunology* 2006 ; 24 : 287-320.
25. Balciunaite G, Ceredig R, Rolink AG. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood* 2005 ; 105 : 1930-6.
26. Benz C, Bleul CC. A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision. *The Journal of Experimental Medicine* 2005 ; 202 : 21-31.
27. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 2008 ; 452 : 764-7.
28. Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *The Journal of Experimental Medicine* 1996 ; 184 : 903-11.
29. Capone M, Hockett Jr. RD, Zlotnik A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998 ; 95 : 12522-7.
30. Livak F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 1999 ; 162 : 2575-80.

31. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg EV. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 2006 ; 24 : 53-64.
32. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU. 1 transcription factors. *Immunity* 2006 ; 25 : 731-44.
33. Franco CB, Scripture-Adams DD, Proekt I, et al. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU. 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 ; 103 : 11993-8.
34. Whitlock CA, Ziegler SF, Treiman IJ, et al. Differentiation of cloned populations of immature B cells after transformation with Abelson murine leukemia virus. *Cell* 1983 ; 32 : 903-11.
35. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. In vitro models of T cell development. *Semin Immunol* 1999 ; 11 : 3-12.
36. Pui JC, Allman D, Xu L, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999 ; 11 : 299-308.
37. Radtke F, Wilson A, Stark G, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999 ; 10 : 547-58.
38. Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S, Nishikawa S. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 1994 ; 22 : 979-84.
39. Williams NS, Moore TA, Schatzle JD, et al. Generation of lytic natural killer 1.1+ Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *The Journal of Experimental Medicine* 1997 ; 186 : 1609-14.
40. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 2002 ; 17 : 749-56.
41. Besseyrias V, Fiorini E, Strobl IJ, et al. Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *The Journal of Experimental Medicine* 2007 ; 204 : 331-43.
42. Mohtashami M, Shah DK, Nakase H, Kianizad K, Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Direct comparison of DLL1- and DLL4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J Immunol* 2010 ; 185 : 867-76.
43. De Smedt M, Hoebeke I, Plum J. Human bone marrow CD34+ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 2004 ; 33 : 227-32.
44. La Motte-Mohs RN, Herer E, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 2005 ; 105 : 1431-9.
45. Wolfer A, Bakker T, Wilson A, et al. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nature Immunology* 2001 ; 2 : 235-41.
46. Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, et al. Regulation of alpha-beta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBPJ signaling. *Immunity* 2004 ; 20 : 611-22.
47. Koch U, Fiorini E, Benedito R, et al. Delta-like 4 is the essential, non-redundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *The Journal of Experimental Medicine* 2008 ; 205 : 2515-23.
48. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *The Journal of Experimental Medicine* 2008 ; 205 : 2507-13.
49. Zakrzewski JL, Kochman AA, Lu SX, et al. Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 2006 ; 12 : 1039-47.
50. Wolkowicz R, Nolan GP. Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. *Gene Ther* 2005 ; 12 : 467-76.
51. Ueno T, Fujiwara M, Tomiyama H, Onodera M, Takiguchi M. Reconstitution of anti-HIV effector functions of primary human CD8 T lymphocytes by transfer of HIV-specific alphabeta TCR genes. *European Journal of Immunology* 2004 ; 34 : 3379-88.
52. Zhao Y, Parkhurst MR, Zheng Z, et al. Extrathymic generation of tumor-specific T cells from genetically engineered human hematopoietic stem cells via Notch signaling. *Cancer Research* 2007 ; 67 : 2425-9.
53. van den Brink MR, Alpdogan O, Boyd RL. Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nature Reviews* 2004 ; 4 : 856-67.
54. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology* 2007 ; 8 : 463-70.
55. Gautreau L, Boudil A, Pasqualetto V, et al. Gene coexpression analysis in single cells indicates lymphomyeloid copriming in short-term hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *J Immunol* 2010 ; 184 : 4907-17.
56. McCormack MP, Young LF, Vasudevan S, et al. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 2010 ; 327 : 879-83.
57. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999 ; 284 : 770-6.
58. Huang EY, Gallegos AM, Richards SM, Lehar SM, Bevan MJ. Surface expression of Notch1 on thymocytes: correlation with the double-negative to double-positive transition. *J Immunol* 2003 ; 171 : 2296-304.
59. Choi JW, Pampeno C, Vukmanovic S, Meruelo D. Characterization of the transcriptional expression of Notch-1 signaling pathway members. Deltex and HES-1, in developing mouse thymocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 2002 ; 26 : 575-88.
60. Wolfer A, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, Radtke F. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 2002 ; 16 : 869-79.
61. Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, et al. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 2004 ; 172 : 5230-9.
62. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor/ligand interactions. *The Journal of Experimental Medicine* 2004 ; 200 : 469-79.
63. Yashiro-Ohtani Y, He Y, Ohtani T, et al. Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev* 2009 ; 23 : 1665-76.
64. Ikawa T, Kawamoto H, Goldrath AW, Murre C. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *The Journal of Experimental Medicine* 2006 ; 203 : 1329-42.
65. Kee BL. E and ID proteins branch out. *Nature Reviews* 2009 ; 9 : 175-84.
66. Laws AM, Osborne BA. p53 regulates thymic Notch1 activation. *European Journal of Immunology* 2004 ; 34 : 726-34.

- 67.** Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988 ; 85 : 5976-80.
- 68.** Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, *et al.* Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* 1995 ; 11 : 40-4.
- 69.** Hattori N, Kawamoto H, Fujimoto S, Kuno K, Katsura Y. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *The Journal of Experimental Medicine* 1996 ; 184 : 1137-47.
- 70.** Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 1996 ; 384 : 474-8.
- 71.** Samson SI, Richard O, Tavian M, *et al.* GATA-3 promotes maturation. IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 2003 ; 19 : 701-11.
- 72.** Pai SY, Truitt ML, Ting CN, Leiden JM, Glimcher LH, Ho IC. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity* 2003 ; 19 : 863-75.
- 73.** Chen D, Zhang G. Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis. *Exp Hematol* 2001 ; 29 : 971-80.
- 74.** Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nature Immunology* 2007 ; 8 : 845-55.
- 75.** Hendriks RW, Nawijn MC, Engel JD, van Doorninck H, Grosveld F, Karis A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *European Journal of Immunology* 1999 ; 29 : 1912-8.
- 76.** Tripathi RK, Mathieu N, Spicuglia S, *et al.* Definition of a T-cell receptor beta gene core enhancer of V(D)J recombination by transgenic mapping. *Molecular and Cellular Biology* 2000 ; 20 : 42-53.
- 77.** Kishi H, Wei XC, Jin ZX, *et al.* Lineage-specific regulation of the murine RAG-2 promoter: GATA-3 in T cells and Pax-5 in B cells. *Blood* 2000 ; 95 : 3845-52.
- 78.** Kieffer LJ, Grealis JM, Landres I, *et al.* Identification of a candidate regulatory region in the human CD8 gene complex by colocalization of DNase I hypersensitive sites and matrix attachment regions which bind SATB1 and GATA-3. *J Immunol* 2002 ; 168 : 3915-22.
- 79.** Hozumi K, Negishi N, Tsuchiya I, *et al.* Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *European Journal of Immunology* 2008 ; 38 : 977-85.
- 80.** Hosoya T, Kuroha T, Moriguchi T, *et al.* GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. *The Journal of Experimental Medicine* 2009 ; 206 : 2987-3000.
- 81.** Paroush Z, Finley Jr. RL, Kidd T, *et al.* Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 1994 ; 79 : 805-15.
- 82.** Nuthall HN, Husain J, McLaren KVV, Stifani S. Role for Hes1-induced phosphorylation in Groucho-mediated transcriptional repression. *Molecular and Cellular Biology* 2002 ; 22 : 389-99.
- 83.** Tomita K, Hattori M, Nakamura E, Nakanishi S, Minato N, Kageyama R. The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 1203-10.
- 84.** Kawamata S, Du C, Li K, Lavau C. Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 2002 ; 21 : 3855-63.
- 85.** Dudley DD, Wang HC, Sun XH. Hes1 potentiates T cell lymphomagenesis by up-regulating a subset of notch target genes. *PLoS One* 2009 ; 4 : e6678.
- 86.** Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, *et al.* Homozygous deletions and point mutations of the Rb1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003 ; 301 : 598-603.
- 87.** Sakata J, Inoue J, Ohi H, *et al.* Involvement of V(D)J recombinase in the generation of intragenic deletions in the Rb1/Bcl11b tumor suppressor gene in gamma-ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 1069-75.
- 88.** Nagel S, Kaufmann M, Drexler HG, Macleod RA. The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). *Cancer Research* 2003 ; 63 : 5329-34.
- 89.** Przybylski GK, Dik WA, Wanzeck J, *et al.* Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia* 2005 ; 19 : 201-8.
- 90.** Cismasiu VB, Adamo K, Gecewicz J, Duque J, Lin Q, Avram D. BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* 2005 ; 24 : 6753-64.
- 91.** Bajoghli B, Aghaallaei N, Hess I, *et al.* Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates. *Cell* 2009 ; 138 : 186-97.
- 92.** Li P, Burke S, Wang J, *et al.* Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 2010 ; 329 : 85-9.
- 93.** Ikawa T, Hirose S, Masuda K, *et al.* An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 2010 ; 329 : 93-6.
- 94.** Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT/WNT situation. *Nature Reviews* 2005 ; 5 : 21-30.
- 95.** Schilham MW, Wilson A, Moerer P, Benaissa-Trouw BJ, Cumano A, Clevers HC. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol* 1998 ; 161 : 3984-91.
- 96.** Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. *Journal of Cell Science* 2007 ; 120 : 385-93.
- 97.** Arce I, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 2006 ; 25 : 7492-504.
- 98.** Staal FJ, Weerkamp F, Baert MR, *et al.* Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol* 2004 ; 172 : 1099-108.
- 99.** Rosenbauer F, Owens BM, Yu L, *et al.* Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nature Genetics* 2006 ; 38 : 27-37.
- 100.** Yoshida T, Ng SY, Zuniga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nature Immunology* 2006 ; 7 : 382-91.
- 101.** Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, *et al.* The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994 ; 79 : 143-56.
- 102.** Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Molecular and Cellular Biology* 2008 ; 28 : 7465-75.
- 103.** Moroy T. The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005 ; 37 : 541-6.

- 104.** Rathinam C, Geffers R, Yucel R, *et al.* The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity* 2005 ; 22 : 717-28.
- 105.** Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, *et al.* Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 2003 ; 18 : 109-20.
- 106.** Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *The Journal of Experimental Medicine* 2003 ; 197 : 831-44.
- 107.** Doan LL, Kitay MK, Yu Q, *et al.* Growth factor independence-1B expression leads to defects in T cell activation. IL-7 receptor alpha expression, and T cell lineage commitment. *J Immunol* 2003 ; 170 : 2356-66.
- 108.** Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC. The transcriptional repressor Gfi-1 antagonizes PU. 1 activity through protein-protein interaction. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 6473-83.
- 109.** DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU. 1. *Science* 2000 ; 288 : 1439-41.
- 110.** DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU. 1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 2002 ; 16 : 297-309.
- 111.** Spain LM, Guerriero A, Kunjibettu S, Scott EW. T cell development in PU. 1-deficient mice. *J Immunol* 1999 ; 163 : 2681-7.
- 112.** McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, *et al.* Targeted disruption of the PU. 1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO Journal* 1996 ; 15 : 5647-58.
- 113.** Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU. 1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994 ; 265 : 1573-7.
- 114.** Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, *et al.* Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature Immunology* 2005 ; 6 : 663-70.
- 115.** Lefebvre JM, Haks MC, Carleton MO, *et al.* Enforced expression of Spi-B reverses T lineage commitment and blocks beta-selection. *J Immunol* 2005 ; 174 : 6184-94.
- 116.** Dionne CJ, Tse KY, Weiss AH, *et al.* Subversion of T lineage commitment by PU. 1 in a clonal cell line system. *Developmental Biology* 2005 ; 280 : 448-66.
- 117.** Smith EM, Akerblad P, Kadesch T, Axelson H, Sigvardsson M. Inhibition of EBF function by active Notch signaling reveals a novel regulatory pathway in early B-cell development. *Blood* 2005 ; 106 : 1995-2001.
- 118.** Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Identification of an early T cell progenitor for a pathway of T cell maturation in the bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999 ; 96 : 14493-8.
- 119.** Garcia-Ojeda ME, Dejbakhsh-Jones S, Chatterjee-Matthes D, *et al.* Stepwise development of committed progenitors in the bone marrow that generate functional T cells in the absence of the thymus. *J Immunol* 2005 ; 175 : 4363-73.
- 120.** Lancrin C, Schneider E, Lambolez F, *et al.* Major T cell progenitor activity in bone marrow-derived spleen colonies. *The Journal of Experimental Medicine* 2002 ; 195 : 919-29.
- 121.** Arcangeli ML, Lancrin C, Lambolez F, *et al.* Extrathymic hematopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. *J Immunol* 2005 ; 174 : 1980-8.
- 122.** Gautreau L, Arcangeli ML, Pasqualetto V, *et al.* Identification of an IL-7-dependent pre-T committed population in the spleen. *J Immunol* 2007 ; 179 : 2925-35.
- 123.** Rodewald HR, Kretzschmar K, Takeda S, Hohl C, Dessing M. Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *The EMBO Journal* 1994 ; 13 : 4229-40.
- 124.** Krueger A, von Boehmer H. Identification of a T lineage-committed progenitor in adult blood. *Immunity* 2007 ; 26 : 105-16.
- 125.** Boileau C, Houde M, Dulude G, Clegg CH, Perreault C. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J Immunol* 2000 ; 164 : 5713-20.
- 126.** Saito H, Kanamori Y, Takemori T, *et al.* Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 1998 ; 280 : 275-8.
- 127.** Lambolez F, Arcangeli ML, Joret AM, *et al.* The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nature Immunology* 2006 ; 7 : 76-82.
- 128.** Peaudecerf L, Ribeiro Dos Santos P, Boudil A, Ezine S, Pardigon N, Rocha B. The role of the gut as a primary lymphoid organ: CD8alphaalpha intraepithelial T lymphocytes in euthymic mice derive from very immature CD44(+) thymocyte precursors. *Mucosal Immunol.*
- 129.** Kato S. Thymic microvascular system. *Microscopy Research and Technique* 1997 ; 38 : 287-99.
- 130.** Allende D, Vidal A, McIntosh TJ. Jumping to rafts: gatekeeper role of bilayer elasticity. *Trends Biochem Sci* 2004 ; 29 : 325-30.
- 131.** Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004 ; 427 : 355-60.
- 132.** Allende ML, Proia RL. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1582 : 222-7.
- 133.** Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 2010 ; 328 : 1129-35.
- 134.** Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 2005 ; 309 : 1735-9.
- 135.** Fiorini E, Merck E, Wilson A, *et al.* Dynamic regulation of notch 1 and notch 2 surface expression during T cell development and activation revealed by novel monoclonal antibodies. *J Immunol* 2009 ; 183 : 7212-22.
- 136.** Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, *et al.* Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International Immunology* 2002 ; 14 : 637-45.
- 137.** Murre C. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nature Immunology* 2005 ; 6 : 1079-86.
- 138.** Sawada S, Littman DR. A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulates its activity in T-cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 1993 ; 13 : 5620-8.
- 139.** Petersson K, Ivars F, Sigvardsson M. The pT alpha promoter and enhancer are direct targets for transactivation by E box-binding proteins. *European Journal of Immunology* 2002 ; 32 : 911-20.
- 140.** Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 2004 ; 3 : 722-4.

- 141.** Gowney JD, Shigematsu H, Li Z, *et al.* Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 2005 ; 106 : 494-504.
- 142.** Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, Taniuchi I, Littman DR. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2007 ; 204 : 1945-57.
- 143.** Hernandez-Munain C, Krangel MS. Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Molecular and Cellular Biology* 1994 ; 14 : 473-83.
- 144.** Kim J, Sif S, Jones B, *et al.* Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 1999 ; 10 : 345-55.
- 145.** Woolf E, Xiao C, Fainaru O, *et al.* Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 ; 100 : 7731-6.
- 146.** Taniuchi I, Osato M, Egawa T, *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002 ; 111 : 621-33.
- 147.** Yannoutsos N, Barreto V, Misulovin Z, *et al.* A cis element in the recombination activating gene locus regulates gene expression by counteracting a distant silencer. *Nature Immunology* 2004 ; 5 : 443-50.
- 148.** Goux D, Coudert JD, Maurice D, *et al.* Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* 2005 ; 106 : 1726-33.
- 149.** Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, *et al.* Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 2006 ; 126 : 755-66.
- 150.** Maier H, Hagman J. Roles of EBF and Pax-5 in B lineage commitment and development. *Semin Immunol* 2002 ; 14 : 415-22.
- 151.** Harker N, Naito T, Cortes M, *et al.* The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* 2002 ; 10 : 1403-15.

Références

A

Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.

Aihara, Y., Buhring, H.J., Aihara, M., and Klein, J. (1986). An attempt to produce "pre-T" cell hybridomas and to identify their antigens. *Eur J Immunol* 16, 1391-1399.

Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Weissman, I.L. (1997). Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89, 1033-1041.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4, 168-174.

Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Dionne, C.J., Arias, A.M., Chen, D., and Rothenberg, E.V. (2002). Definition of regulatory network elements for T cell development by perturbation analysis with PU.1 and GATA-3. *Dev Biol* 246, 103-121.

Arcangeli, M.L., Lancrin, C., Lambolez, F., Cordier, C., Schneider, E., Rocha, B., and Ezine, S. (2005). Extrathymic hemopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. *J Immunol* 174, 1980-1988.

B

Besseyrias, V., Fiorini, E., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Dumortier, A., Koch, U., Arcangeli, M.L., Ezine, S., Macdonald, H.R., and Radtke, F. (2007). Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* 204, 331-343.

Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.

Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., *et al.* (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 251-264.

Buza-Vidas, N., Duarte, S., Luc, S., Bouriez-Jones, T., Woll, P.S., and Jacobsen, S.E. (2011). GATA3 is redundant for maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 1291-1293.

C

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.

Chatterjea-Matthes, D., Garcia-Ojeda, M.E., Dejbakhsh-Jones, S., Jerabek, L., Manz, M.G., Weissman, I.L., and Strober, S. (2003). Early defect prethymic in bone marrow T cell progenitors in athymic nu/nu mice. *J Immunol* 171, 1207-1215.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.

D

Dejbakhsh-Jones, S., Garcia-Ojeda, M.E., Chatterjea-Matthes, D., Zeng, D., and Strober, S. (2001). Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7455-7460.

Dejbakhsh-Jones, S., and Strober, S. (1999). Identification of an early T cell progenitor for a pathway of T cell maturation in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14493-14498.

DeKoter, R.P., Lee, H.J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16, 297-309.

DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

Dias, S., Mansson, R., Gurbuxani, S., Sigvardsson, M., and Kee, B.L. (2008). E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity* 29, 217-227.

Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.

E

Ellis, S.L., and Nilsson, S.K. (2012). The location and cellular composition of the hemopoietic stem cell niche. *Cytotherapy* 14, 135-143.

Engel, I., and Murre, C. (2001). The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol* 1, 193-199.

G

Garcia-Ojeda, M.E., Dejbakhsh-Jones, S., Chatterjea-Matthes, D., Mukhopadhyay, A., BitMansour, A., Weissman, I.L., Brown, J.M., and Strober, S. (2005). Stepwise development of committed progenitors in the bone marrow that generate functional T cells in the absence of the thymus. *J Immunol* 175, 4363-4373.

Gautreau, L., Arcangeli, M.L., Pasqualetto, V., Joret, A.M., Garcia-Cordier, C., Megret, J., Schneider, E., and Ezine, S. (2007). Identification of an IL-7-dependent pre-T committed population in the spleen. *J Immunol* 179, 2925-2935.

Gautreau, L., Boudil, A., Pasqualetto, V., Skhiri, L., Grandin, L., Monteiro, M., Jais, J.P., and Ezine, S. (2010). Gene coexpression analysis in single cells indicates lymphomyeloid copriming in short-term hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *J Immunol* 184, 4907-4917.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Gossens, K., Naus, S., Corbel, S.Y., Lin, S., Rossi, F.M., Kast, J., and Ziltener, H.J. (2009). Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med* 206, 761-778.

H

Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173, 1213-1225.

Hosoya, T., Kuroha, T., Moriguchi, T., Cummings, D., Maillard, I., Lim, K.C., and Engel, J.D. (2009). GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. *J Exp Med* 206, 2987-3000.

Hsu, C.L., Kikuchi, K., and Kondo, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is involved in myeloid lineage commitment. *Blood* 110, 1420-1428.

I

Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A.W., and Murre, C. (2006). E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* 203, 1329-1342.

Ikuta, K., and Weissman, I.L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1502-1506.

K

Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., and Ishikawa, H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med* 184, 1449-1459.

Karsunky, H., Inlay, M.A., Serwold, T., Bhattacharya, D., and Weissman, I.L. (2008). Flk2⁺ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111, 5562-5570.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.

Kondo, M., Scherer, D.C., Miyamoto, T., King, A.G., Akashi, K., Sugamura, K., and Weissman, I.L. (2000). Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407, 383-386.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

Krueger, A., and von Boehmer, H. (2007). Identification of a T lineage-committed progenitor in adult blood. *Immunity* 26, 105-116.

Krueger, A., Willenzon, S., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E., and Forster, R. (2010). CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 115, 1906-1912.

Ku, C.J., Hosoya, T., Maillard, I., and Engel, J.D. (2012). GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood* 119, 2242-2251.

L

Lai, A.Y., and Kondo, M. (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 203, 1867-1873.

Lai, A.Y., and Kondo, M. (2008). T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol* 20, 207-212.

Lai, A.Y., Lin, S.M., and Kondo, M. (2005). Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* 175, 5016-5023.

Lai, A.Y., Watanabe, A., O'Brien, T., and Kondo, M. (2009). Pertussis toxin-sensitive G proteins regulate lymphoid lineage specification in multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 113, 5757-5764.

Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006). Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25, 731-744.

Lambole, F., Arcangeli, M.L., Joret, A.M., Pasqualetto, V., Cordier, C., Di Santo, J.P., Rocha, B., and Ezine, S. (2006). The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nat Immunol* 7, 76-82.

Lambole, F., Azogui, O., Joret, A.M., Garcia, C., von Boehmer, H., Di Santo, J., Ezine, S., and Rocha, B. (2002). Characterization of T cell differentiation in the murine gut. *J Exp Med* 195, 437-449.

Lancrin, C., Schneider, E., Lambole, F., Arcangeli, M.L., Garcia-Cordier, C., Rocha, B., and Ezine, S. (2002). Major T cell progenitor activity in bone marrow-derived spleen colonies. *J Exp Med* 195, 919-929.

Lloberas, J., Soler, C., and Celada, A. (1999). The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today* 20, 184-189.

M

Maeda, T., Merghoub, T., Hobbs, R.M., Dong, L., Maeda, M., Zakrzewski, J., van den Brink, M.R., Zelent, A., Shigematsu, H., Akashi, K., *et al.* (2007). Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* *316*, 860-866.

Maillard, I., Schwarz, B.A., Sambandam, A., Fang, T., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A., and Pear, W.S. (2006). Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* *107*, 3511-3519.

Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 838-849.

Mellentin, J.D., Smith, S.D., and Cleary, M.L. (1989). *lxl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* *58*, 77-83.

Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H.T., and Forster, R. (2004). Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* *200*, 481-491.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.

Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* *124*, 1929-1939.

Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* *1*, 661-673.

Mourcin, F., Breton, C., Tellier, J., Narang, P., Chasson, L., Jorquera, A., Coles, M., Schiff, C., and Mancini, S.J. (2011). Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* *117*, 6552-6561.

N

Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* *6*, 107-116.

Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X., and Leonard, W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* *262*, 1877-1880.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* *333*, 218-221.

O

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33, 387-399.

P

Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D., and Lindenbaum, M.H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11, 40-44.

Parcelier, A., Maharzi, N., Delord, M., Robledo-Sarmiento, M., Nelson, E., Belakhdar-Mekid, H., Pla, M., Kuranda, K., Parietti, V., Goodhardt, M., *et al.* (2011). AF1q/MLLT11 regulates the emergence of human prothymocytes through cooperative interaction with the Notch signaling pathway. *Blood* 118, 1784-1796.

Peaudecerf, L., dos Santos, P.R., Boudil, A., Ezine, S., Pardigon, N., and Rocha, B. (2011). The role of the gut as a primary lymphoid organ: CD8alphaalpha intraepithelial T lymphocytes in euthymic mice derive from very immature CD44+ thymocyte precursors. *Mucosal Immunol* 4, 93-101.

Peixoto, A., Monteiro, M., Rocha, B., and Veiga-Fernandes, H. (2004). Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res* 14, 1938-1947.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955-1960.

Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., and Pear, W.S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308.

R

Radtke, F., Fasnacht, N., and Macdonald, H.R. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity* 32, 14-27.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.

Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.

Rocha, B., Guy-Grand, D., and Vassalli, P. (1995). Extrathymic T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 7, 235-242.

Rodewald, H.R. (2008). Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 26, 355-388.

Rodrigues, N.P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D.M., Boyd, A.S., Orkin, S.H., Enver, T., Vyas, P., and Scadden, D.T. (2005). Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 106, 477-484.

Rothenberg, E.V., Moore, J.E., and Yui, M.A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8, 9-21.

S

Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., and Ishikawa, H. (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 280, 275-278.

Saran, N., Lyszkiewicz, M., Pommerenke, J., Witzlau, K., Vakilzadeh, R., Ballmaier, M., von Boehmer, H., and Krueger, A. (2010). Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. *Blood* 115, 1137-1144.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.

Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2004). Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol* 5, 953-960.

Seet, C.S., Brumbaugh, R.L., and Kee, B.L. (2004). Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *J Exp Med* 199, 1689-1700.

Serwold, T., Ehrlich, L.I., and Weissman, I.L. (2009). Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* 113, 807-815.

Spain, L.M., Guerriero, A., Kunjibettu, S., and Scott, E.W. (1999). T cell development in PU.1-deficient mice. *J Immunol* 163, 2681-2687.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.

Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.

Sultana, D.A., Zhang, S.L., Todd, S.P., and Bhandoola, A. (2012). Expression of functional P-selectin glycoprotein ligand 1 on hematopoietic progenitors is developmentally regulated. *J Immunol* 188, 4385-4393.

T

Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1998). The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16, 7-15.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., and Leiden, J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

W

Wada, H., Masuda, K., Satoh, R., Kakugawa, K., Ikawa, T., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452, 768-772.

Wilson, A., Held, W., and MacDonald, H.R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J Exp Med* 179, 1355-1360.

Wurbel, M.A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Richelme, M., Carrier, A., and Malissen, B. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gammadelta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 98, 2626-2632.

Y

Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717-2723.

Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., *et al.* (2009). Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev* 23, 1665-1676.

Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, M., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (1999). Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* 400, 682-687.

Yui, M.A., Feng, N., and Rothenberg, E.V. (2010). Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J Immunol* 185, 284-293.

Z

Zhuang, Y., Cheng, P., and Weintraub, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 16, 2898-2905.

Zohren, F., Souroullas, G.P., Luo, M., Gerdemann, U., Imperato, M.R., Wilson, N.K., Gottgens, B., Lukov, G.L., and Goodell, M.A. (2012). The transcription factor Lyl-1 regulates lymphoid specification and the maintenance of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 13, 761-769.